

München, 1960.

Physikalisch-chemische Untersuchungen zur
Anwendung der Anilinblau-Orange-Eisessig-Färbung
für die Darstellung von Kollagen

Karl Artur Beller

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Komm. Vorstand: Priv. Doz. Dr. L. Kotter

PHYSIKALISCH-CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ANWENDUNG DER
ANILINBLAU-ORANGE-EISESSIG-FÄRBUNG
FÜR DIE DARSTELLUNG VON KOLLAGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Karl Artur Beller

aus

Kenzingen / Breisgau

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. Zipf

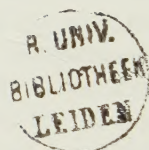
Referent: Prof. Dr. H. Sedlmeier

Tag der Promotion: 26. Februar 1960

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	LITERATUR	2
I.	Zum Wesen des histologischen Färbevorganges (Färbetheorien)	2
1.	Lösungstheorie	2
2.	Diffusionstheorie	3
3.	Salzbildungstheorie	3
4.	Durchtränkungs- und Niederschlagstheorie	4
5.	Elektrostatistische Theorie	7
6.	Gleichgewichtstheorie	9
7.	Grenzflächentheorie	13
II.	Der Einfluß der Fixation auf die Färbbarkeit histologischer Elemente	19
C.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
I.	Der Einfluß verschiedener Fixierungsmittel und verschiedener p_H -Werte der Farblösung auf die Färbbarkeit kollagener und nicht kollagener Eiweißkörper	22
II.	Der Einfluß von HCl auf Quellung und Färbbarkeit kollagener Gewebe (Schwarten und Sehnen)	25
III.	Der Einfluß von NaCl auf die Färbbarkeit von Gelatine mit Anilinblau-Orange	31
IV.	Quellungsversuche mit Gelatine-Pulver	32
1.	Quellung von Gelatine-Pulver in NaCl-Lösungen	33
2.	Quellung von Gelatine-Pulver in Formalin-Lösungen	35
V.	Diffusionsversuche mit den Farbstoffen "Anilinblau wasserlöslich" und "Orange G"	37
VI.	Farbstoffentzug durch Wässern	38
D.	DISKUSSION	40
E.	ZUSAMMENFASSUNG	44
F.	LITERATURVERZEICHNIS	45
	LEBENS LAUF	



A. EINLEITUNG

Beim Kattern des Brühwurstbräts werden nicht nur Muskelfaserverbände zum größten Teil zerstört, sondern aus den Muskelfasern sogar Eiweiß freigesetzt. Das kollagene Gewebe widersteht den Einflüssen beim Kattern weit besser, verliert aber seine bekannten Feinstrukturen beim nachfolgenden Erhitzen durch Quellen und Verleimen ebenfalls weitgehend. Muskelgewebe und Bindesubstanzen liegen daher im histologischen Bild von Brühwürsten z. T. in Form ihrer Grundsubstanzen Aktomyosin und Kollagen vor, weshalb eine Erfassung von kollagenem Gewebe neben Muskulatur auf Grund spezifischer Strukturen oft auf große Schwierigkeiten stößt, insbesondere bei Anwendung verfeinerter Zerkleinerungsmethoden. KOTTER und Mitarbeiter (22, 24, 25, 26) haben daher vorgeschlagen, wenigstens Kollagen und Muskeleiweiß "histochemisch" darzustellen und dann die Volumenanteile dieser beiden Substanzen histometrisch zu bestimmen. Als Färbemethode hat sich die von KOTTER und Mitarbeiter (22, 23, 24, 26) modifizierte Azanfärbung nach HEIDENHAIN mit Anilinblau-Orange-Eisessig bewährt.

Da die Ergebnisse aus der histometrischen Kollagenbestimmung auch forensisch verwertet werden **sollen**, müssen die Vorgänge bei der Anilinblau-Orange-Eisessig-Färbung genauer bekannt sein. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen physikalisch-chemischen Beitrag leisten.

B. LITERATUR

I. Zum Wesen des histologischen Färbvorganges (Färbetheorien)

Die histologische Färbung dient dem Zweck, Gewebsstrukturen darzustellen und Gewebselemente möglichst unterschiedlich anzufärben. Um das Wesen der histologischen Färbungen aufzuklären, wurden bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt und von einzelnen Modellen Hypothesen für eine allgemeine Färbetheorie abgeleitet. Je nach Wahl der Modelle und der Betrachtungsweisen sind so mehrere Färbetheorien entstanden, von denen jede für bestimmte Färbvorgänge zutrifft, von denen aber keine allgemeine Gültigkeit erlangen konnte. Farbstoffanziehung und Farbstoffbindung im Gewebe erfolgen durch unterschiedliche Kräfte, so daß es nach ROULET (54) unwahrscheinlich ist, jemals eine einheitliche Färbetheorie zu finden. Nachstehend seien die verschiedenen Färbetheorien gesondert besprochen:

1. Lösungstheorie

Die Lösungstheorie, welche von WITT (63) aufgestellt worden ist, besagt, daß sich der Farbstoff zwischen Lösung und dem zu färbenden Substrat in einem konstanten Verhältnis verteilt. WITT sagt von seiner Theorie: "Sie faßt den Färbeprozess als einen chemischen Vorgang auf und sieht in der gefärbten Substanz eine chemische Verbindung, jedoch nicht nach den Molekularverhältnissen, sondern nach schwankenden Verhältnissen, genauso wie sie beim Zustandekommen irgendwelcher Lösungen obwalten". (63) WITT weist darauf hin, daß Gewebsfasern zwar festen Aggregatzustand haben, durch ihren kolloidalen Charakter aber Wasser- und Farbstoffmoleküle aufnehmen können. Daß die Aufnahme bestimmter Farbstoffe durch bestimmte Substrate Ausdruck einer besseren Löslichkeit des Farbstoffes im Substrat ist, trifft auch für einige Sonderfälle in der histologischen Färberei zu. Vor allem gilt dies für die Fettfärbung. MICHAELIS (37) sieht im Gegensatz zu WITT (63) in diesen Färbungen den Prototyp für die "physikalische" Theorie. "Bei der Fettfärbung liegt der physikalische Charakter der Färbung so klar zu Tage, daß für diesen Fall die Lösungstheorie auch von Forschern anerkannt wird, die dieselbe im übrigen zugunsten anderer Vorstellungen aufgegeben haben"(4). Die Eigenschaft be-

stimmter Farbstoffe, sich in den Fetten als den besseren Lösungsmitteln zu lösen, ist jedoch eine Erscheinung, die an die chemische Konstitution der Farbstoffe gebunden ist. MEIER (34) hat festgestellt, daß die Fettfärbung über eine Grenzflächenadsorption erfolgt, und daß auf Grund der großen Geschwindigkeit des Adsorptionvorganges der gleichzeitig erfolgende Lösungsvorgang vollkommen in den Hintergrund tritt. LOTTERMOSER (33) meint, daß die Lösungstheorie keine allgemeine Bedeutung besitzt und nur für einige Sonderfälle gilt.

2. Diffusionstheorie

FISCHER (15) hat in Modellversuchen nachgewiesen, daß Diffusionsgeschwindigkeit, Konzentration der Farblösung und Porengröße des Objektes (Strukturdichte) für die histologische Färbung von Bedeutung sind. V. MÖLLENDORFF und KREBS (40) haben die Diffusionsgeschwindigkeit der Farblösungen als Ursache der Farbstoffverteilung im histologischen Präparat betrachtet. Dabei ist die Strukturdichte der Gewebe und die Dispersität des Farbstoffes für die Geschwindigkeit des Färbvorganges verantwortlich. Die Farbstoffe sind demzufolge Reagentien auf Dichteverhältnisse nicht aber auf chemische Eigenschaften. Zur Echtheit der Färbung sagt BECHER (4), "daß einerseits die Molekülgröße des Farbstoffes und andererseits die Größe der Poren zwischen den Teilchen des Gewebes ("Mizellen") - also die Harmonie zwischen diesen beiden Größen - von ausschlaggebender Bedeutung sind". Viele Vorgänge sind aber auch mit dieser Diffusionstheorie nicht zu erklären; jedoch nimmt BECHER (4) an, "daß Diffusion und physikalische Verdrängungserscheinungen eine große Rolle spielen, deren Anteil sich einstweilen nicht genau präzisieren läßt."

Auch die leichte "Abziehbarkeit" mancher Farbstoffe sollte für die physikalischen Theorien sprechen. "Die Ausziehbarkeit einer Färbung kann jedoch nicht als Beweis ihrer rein physikalischen Natur gelten, vielleicht handelt es sich um Vorgänge, bei denen Physikalisches (Lösung) und Chemisches ineinandergreifen"(4).

3. Salzbildungstheorie

Aber gerade die Tatsache, daß gefärbten Substraten zwar durch Wässern oder Behandlung mit energischen Entfärbern ein Teil des gebundenen Farbstoffes entzogen werden konnte, daß aber ein Rest von Farbstoff fest fixiert

blieb, sprach zugunsten eines chemischen Vorganges bei der Färbung. EHRLICH (8) hat diese Restbindung als chemische Farbstoffaffinitäten der Gewebeiweiße angesprochen. Da die Eiweißkörper saure und basische Gruppen enthalten, die zur Bildung von Salzen befähigt sind, wurden auch salzartige Bindungen der Farbstoffe angenommen. In diesem Zusammenhang werden auch zum ersten Mal die Begriffe "basophil", "azidophil" und "neutrophil" für die histologischen Elemente gebraucht. Besonders HEIDENHAIN (21) hat die salzartige Bindung zwischen Eiweiß und Farbstoff zu beweisen versucht. Er konnte zeigen, daß gelöste Eiweißkörper in vitro häufig mit Farbstoffen Niederschläge geben, und zwar Eiweißkörper mit überwiegend saurem Charakter besonders mit basischen Farbstoffen und umgekehrt. Die Verstärkung der Aufnahme von sauren Farbstoffen durch Zusatz von Säure und der analoge Effekt bei Zusatz von Alkali zu basischen Farbstoffen wurde als Folge einer erhöhten Dissoziation der Farbsalze gedeutet. Eine wesentliche Voraussetzung dieser chemischen Theorie, das Bestehen klar erkennbarer stöchiometrischer Beziehungen zwischen Farbstoff und Substrat, war jedoch in den meisten Fällen nicht nachzuweisen. BECHER (4) meint hierzu, "daß die chemische Theorie weiter ist als die Salzbildungstheorie, von der sie ausging. Es gibt Färbevorgänge, die nicht auf Salzbildung, wahrscheinlich aber auf dem Zustandekommen chemischer Additionsverbindungen beruhen". Zahlreiche Beobachtungen waren aber chemisch allein nicht zu erklären.

4. Durchtränkungs- und Niederschlagstheorie.

Ausgehend von der Formulierung von KREBS (27), daß die Verteilung eines Farbstoffes im quergestreiften Skelettmuskel bedingt sei 1. durch die Dichteverhältnisse im Gewebe und 2. durch die Diffusibilität des Farbstoffes, gelangt v. MÖLLENDORFF (41) zu dem Schluß, daß für die Anreicherung von Farbstoffen im Muskelzytoplasma chemische Kräfte nicht in Frage kommen. V. MÖLLENDORFF erklärt das Verhalten der Mehrzahl der Strukturen gegenüber den beiden großen Farbstofftypen (basisch und sauer) auf andere Weise: Das abweichende Verhalten der basischen von den sauren Farbstoffen sei durch eine morphologisch faßbare Eigenschaft der meisten basischen Farbstoffe bedingt. Eine besondere Eigenschaft der basischen Farbstoffe, ihre Ausflockbarkeit, ist dafür verantwortlich, daß gewisse Gewebsbestandteile (Zellkerne, Schleim, Mastzellenkörper, Knorpelinterzellularsubstanz) sich mit basischen Farbstoffen anders färben als mit sauren. V. MÖLLENDORFF bezeichnet die auf der Ausflockung der basischen Farb-

stoffe beruhende Färbung als Niederschlagsfärbung. Die Niederschlagsfärbung sei es, welche die charakteristische basische Färbung von der sauren unterscheidet.

Den Gegensatz zur Niederschlagsfärbung bilde die Durchtränkungsfärbung: "Sie ist basischen und sauren Farbstoffen gemeinsam und zeichnet sich rein optisch schon durch ihre leuchtende Durchsichtigkeit vor der Niederschlagsfärbung aus und weiterhin dadurch, daß sie stets in dem Farbton erfolgt, der der vollkommenen Lösung des betreffenden Farbstoffes entspricht".

Die Durchtränkungsfärbung ist rein physikalisch bedingt. Sie ist durch die Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe und die Strukturdichte der Substrate bedingt. Die Tatsache, daß die Tinktion von Textilstoffen und Eiweißkörpern mit sauren Farbstoffen durch Säurezusatz begünstigt wird, führt v. MÖLLENDORFF auf eine Dispersitätsänderung in Form einer Dispersitätsverminderung durch die erhöhte saure Reaktion des Dispersionsmittels zurück.

V. MÖLLENDORFF faßt seine Versuchsergebnisse wie folgt zusammen:

1. "Saure Farbstoffe färben progressiv um so rascher, je diffusibler sie sind; Elektionen kommen um so prägnanter zum Vorschein, je kolloider die Farbstoffe sind.
2. Die Farbe dringt in die verschiedenen Strukturen verschieden schnell ein und haftet bei der Differenzierung an denjenigen Strukturen am längsten, in die sie zuletzt eingedrungen ist."

Die Verteilung der sauren Farbstoffe folge daher nicht chemischen, sondern physikalischen Gesetzen. V. MÖLLENDORFF läßt die Frage offen, ob für die Bindung der Farbstoffe an den einzelnen Strukturen besonders chemische oder physikalische Attraktionskräfte in Betracht kommen.

Einen weiteren Beweis für die physikalische Farbenelektion sieht v. MÖLLENDORFF in den Mehrfachfärbungen aus homogenen sauren Gemischen. Zur differentiellen Darstellung verschiedener Strukturen seien nämlich Farbstoffgemische notwendig, deren einzelne Komponenten unterschiedlich diffundieren. Der weniger diffusionsfähige Farbstoff dringe lediglich in die lockeren Strukturen ein, während die engen Strukturen vom diffusionsfähigeren Farbstoff besetzt werden. Die Anhänger der chemischen Theorie nehmen jedoch

an, daß chemische Verwandtschaften der einzelnen in den Gemischen dargebotenen Farben zu bestimmten Gewebsbestandteilen die Verteilung der Farbstoffe regeln. Hierzu v. MÖLLENDORFF: "Ich möchte nur hervorheben, daß wir bei unseren Beobachtungen das Märchen von einer besonderen Affinität einzelner Farbstoffe (etwa Säurefuchsin zum Kollagen) restlos zerstören konnten. Säurefuchsin kann man durchaus an die Stelle von Pikrinsäure im Gewebe zwingen - also mit ihm Muskeln, Blutkörperchen, Cytoplasma von Epithelien etc. färben -, wenn man es im geeigneten Mischungsverhältnis zusammen mit einem kolloidalen Farbstoff, etwa Isaminblau oder Methylenblau, anbietet. Das Säurefuchsin ist also nur in Verbindung mit einem diffusiblen Farbstoff, und auch dann nur bei ganz bestimmter Anwendung, für kollagene Fibrillen spezifisch."

V. MÖLLENDORFF macht bei seinen Versuchen über die Verteilung der basischen Farbstoffe im fixierten Präparat mit Toluidinblau die Feststellung, daß mit steigender Konzentration der Farbflotte sich das Bild vollständig ändert. Die schon bei schwacher Konzentration hellblau gefärbten elastischen Fasern färben sich auch mit zunehmender Konzentration nicht wesentlich mehr (Durchtränkungsfärbung), hingegen steigert sich mit Zunahme der Konzentration die Violett-färbung. Diese violett gefärbten Teile haben ein fein- oder grobkörniges Aussehen. "Man hat bei der Betrachtung des Präparates geradezu den Eindruck, daß es zu einer Farbstoffausflockung an der Grenzfläche feiner und feinsten Strukturen gekommen ist". V. MÖLLENDORFF bezeichnet dieses Bild als Niederschlagsfärbung: "Die Färbung ist mit Toluidinblau rot, also metachromatisch, sitzt nicht in sondern an der Oberfläche einer Struktur und ist körnig."

V. MÖLLENDORFF hat die Erklärung für diese Vorgänge an Hand von Flockungsversuchen gegeben; basische Farbstoffe wurden mit einem sauren Eiweißkörper zur Flockung gebracht. Die Metachromasie finde ihre Erklärung in der Ausfällung der Farbstofflösung mit sauren Kolloiden, wobei das Fällungsprodukt vom Farbton der vollkommenen Lösung des Farbstoffes ebenfalls abweiche.

Nach ausgedehnten Untersuchungen über die Einwirkung bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen (W_k) auf die Färbung kommt PISCHINGER (46) zu dem Schluß, daß das Wesentliche der Färbung mit Toluidinblau und Cyanol in einer polaren Adsorption der Farbe an das Substrat besteht. Nach

PISCHINGER sind für die Differenzierung die verschiedenen Ladungen der Strukturen verantwortlich, während sie nach v. MÖLLENDORF auf Unterschiede in der Dichte der Strukturen zurückzuführen ist.

Nach PISCHINGER (46) und RHODE (52) muß dichtes Gewebe dunkler erscheinen als lockeres, wenn beide dieselbe Ladung besitzen, da das dichte die adsorbierenden Teilchen konzentrierter enthält als das lockere. Vorbedingung für diese Unterscheidung sei jedoch, daß durch ein günstiges Ladungsverhältnis zwischen Farbstoff und Gewebe die Möglichkeit zur Färbung überhaupt gegeben ist. Auch ein sehr dichtes Gewebe könne ganz oder fast ganz ungefärbt bleiben, wenn es nicht die Ladung besitzt, die zu dem angebotenen Farbstoff paßt.

V. MÖLLENDORFF (41) hat durch einen Zusatz von Säure oder Lauge zu Gelatine eine Änderung der Eindringungsgeschwindigkeit der Farbstoffe beobachtet und als Ursache dafür eine Dispersitätsänderung der Farbstoffe angenommen.

PISCHINGER (46) führt die Änderung der Eindringungsgeschwindigkeit auf eine Änderung des Adsorptionvermögens der Gelatine zurück. Aus Flockungsversuchen hat sich ergeben, daß für den Flockungseffekt das Ladungsverhältnis zwischen Farbstoff und Eiweißkolloid maßgebend ist, wobei das Flockungsprodukt aus maximal entladenen Bindungsprodukten zwischen allen im System vorhandenen Komponenten besteht. Desweiteren findet PISCHINGER in seinen Versuchen keinerlei Anhaltspunkte für eine oberflächliche Farblokalisation in Form von Farbflocken; seine Versuche weisen vielmehr darauf hin, daß auch bei der Niederschlagsfärbung der Farbstoff innerhalb der Strukturen adsorbiert wird.

5. Elektrostatische Theorie.

Sowohl in der technischen wie in der histologischen Färberei ist bekannt, daß durch Zusatz von Säure oder Alkali zu den Farbstofflösungen die Färbungsintensität geändert wird.

Schon BETHE (5) hat für die Färbung mit basischen Farbstoffen eine Abhängigkeit der Färbungsintensität von der Wk festgestellt, und zwar derart, daß sich Gewebe mit zunehmender alkalischer Reaktion kräftiger, mit zunehmender saurer Reaktion schwächer färbten. PISCHINGER (45) hat später diesbezüglich. Untersuchungen auch auf saure Farbstoffe ausgedehnt. Zu diesem Zweck

stellte er Adsorptionsversuche an mit je einem sauren und einem basischen hochdispersen Farbstoff (Cyanol und Toluidinblau) und bestimmte das Aufnahmevermögen verschiedener Substanzen (Gelatine, Hühnereiweiß etc.) für diese Farbstoffe in Lösungen verschiedener Wk. Wie erwartet, wurde mit steigender Wk der basische Farbstoff weniger, der saure vermehrt adsorbiert. Diese Änderung der Adsorption vollzieht sich aber nicht gleichmäßig, sondern in einem gewissen p_H -Bereich rascher und steiler als in den übrigen. Die Lage des optimalen Bereiches wechselt je nach Art des Eiweißkörpers. Es ist anzunehmen, daß hierbei die elektrostatischen Eigenschaften der Eiweißkörper eine besondere Rolle spielen(45). PELET - JOLIVET (43) weist ebenfalls auf die Bedeutung des Umladungspunktes der Eiweißkörper für die Färbung hin. Gemäß ihrer Ampholytnatur sind die Eiweißkörper bei einem p_H unter dem isoelektrischen Punkt (I.P.) positiv und darüber negativ geladen.

PISCHINGER (45) bestimmt die Lage der Umladungspunkte seiner Versuchsobjekte nach ihrer kataphoretischen Wanderungsrichtung bei verschiedener Wk. Die hierbei ermittelten Werte stimmten mit jenen überein, bei denen die Adsorptionskurven rasch abfielen, was den Schluß zuläßt, daß der Reaktionsbereich, in dem sich die rasche Abnahme der Färbung vollzieht, mit der Lage des I.P. der fraglichen Substanzen zusammenhängt. Die Verminderung der Fähigkeit einer Substanz, Farbstoff zu adsorbieren, hat also ihre Ursache im Verlust der Überschußladung des entsprechenden Kolloides.

LOEB (32) hat die Aufnahme anorganischer Ionen durch Gelatine in Abhängigkeit von der Wk untersucht und festgestellt, daß es sich bei der Aufnahme von Ionen durch Eiweißkolloide um eine chemische Bindung handelt. Dem hält PISCHINGER entgegen, bei dessen Versuchen mit Toluidinblau in stark saurer Lösung die Farbstoffkonzentration im Kolloid geringer als in der betreffenden Lösung war, daß seine Versuche für einen Adsorptionsvorgang und nicht für eine chemische Bindung sprechen.

Zu diesem Problem schreibt ZEIGER (65): "Die Ansicht, daß die elektrostatische Ladung fixierter Gewebs- und Zellelemente für die Aufnahme hochdisperser, nicht umladbarer Farbstoffe entscheidend ist, bringt natürlich eine Revision der Begriffe Basophilie und Azidophilie mit sich. Auf Grund des umfangreichen Beweismaterials verlieren diese Worte ihren ursprünglich mehr chemischen Sinn. Jedenfalls ist es in Zukunft angebracht,

anstatt von Substraten mit saurem oder basischem Charakter von solchen mit relativ negativer oder positiver Ladung zu sprechen. Daß den elektrischen Faktoren von Farbstoffen und Substraten neben den chemischen und dem Faktor der Teilchengröße in der Fixationshistologie ganz allgemein eine führende Rolle zukommt, steht nach allen bisherigen Erfahrungen außer jedem Zweifel."

6. Gleichgewichtstheorie

ELÖD (9) hat durch Anwendung der Donnanschen Theorie der Membrangleichgewichte auf die Färbeprozesse mit sauren Farbstoffen eine weitergehende Klärung herbeiführen können (17). Die Donnan-Gleichgewichte (7) kommen durch Effekte elektrischer und anderer Natur zustande, die dann auftreten, wenn in einem System zwei Elektrolytlösungen durch eine Membran voneinander getrennt sind, die für die meisten der anwesenden Ionenarten durchlässig, für mindestens eine Ionenart aber undurchlässig ist. Die Anwesenheit von Elektrolyten mit einer Ionenart, die aus irgendwelchen Gründen nicht nach allen Gebieten des Systems hindiffundieren kann, hat eine ungleichmäßige Verteilung aller anwesenden Ionenarten zur Folge. Dieser besondere Zustand der ungleichmäßigen Ionenverteilung ist das wesentliche Kennzeichen der Donnan-Gleichgewichte. Die Membran ist dabei nicht wesentlich. Die notwendige Bedingung ist auch erfüllt, wenn wenigstens eine an dem System beteiligte Ionenart an der freien Diffusion gehindert ist (6).

LOEB (31) hat festgestellt, daß die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Gelatine der Donnanschen Theorie entsprechen. Es kommt zu der Auffassung, daß die Proteine mit den Säuren bzw. Alkalien Proteinsalze bilden nach allgemein gültigen stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten. Die Donnansche Theorie hat jedoch auch dann Gültigkeit, wenn die Säuren oder Alkalien nur adsorptiv von den Proteinen festgehalten werden.

PROCTER und WILSON (48, 49) konnten zeigen, daß die Quellung der Gelatine bei Erhöhung der HCl-Konzentration ein Maximum erreicht und dann wieder geringer wird. Dies sei nach DONNAN (7) mit der ungleichen Verteilung von diffusiblen Ionen im System Gelatine - Salzsäure - Wasser zu erklären. Die Cl-Ionen werden durch die Bildung von Gelatinechlorid elektrostatisch von den fixen Gelatine-Kationen festgehalten. Die Einstellung eines Gleichgewichtes



wie es DONNAN verlangt, nehmen PROCTER und WILSON als gegeben an. Sie haben den Verlauf der Quellung in Abhängigkeit von der Wk voraus berechnet und konnten mit dem experimentellen Befund gute Übereinstimmung feststellen.

KÜNTZEL (28) hat dagegen eingewendet, daß DONNAN für die Gleichung des Membrangleichgewichtes vorausgesetzt habe, daß auf beiden Seiten der Membran gleiche Mengen Flüssigkeit sein müßten. In einer Fußnote bei DONNAN (7) kommt jedoch zum Ausdruck, daß ungleiche Volumina beiderseits der Membran sich bei den früheren Rechnungen in ähnlicher Weise behandeln lassen.

Den Färbevorgang tierischer Fasern mit sauren Farbstoffen deuten ELÖD und SILVA (12) als einen Vorgang, der aus vielen Teilreaktionen zusammengesetzt ist, die so weitgehend ineinandergreifen, daß sie nicht mit genügender Sicherheit einzeln zu verfolgen sind. Zunächst werden Proteinsalze zwischen Proteinfaser und der rasch diffundierenden farblosen Säure gebildet (d. i. die zusätzliche Säure, die bei Ausführung von Färbungen mit Säurefarbstoffen benötigt wird). Die Proteinsalzbildung führt zu Gleichgewichten in den Systemen Proteinfaser - Säure - Wasser, die der Donnan-Theorie entsprechen. Gleichzeitig werden auch die Farbsäureanionen in der unbeweglichen Phase des Systems konzentriert. Für den weiteren Verlauf der Färbung geben ELÖD und SILVA (12) zwei Möglichkeiten an:

- a) Es können sich schwerlösliche Verbindungen zwischen Protein und Farbstoffanion bilden und so das Gleichgewicht verschieben, wodurch eine weitere Farbstoffaufnahme möglich ist.
- b) Andererseits kann infolge der Anreicherung des Farbstoffanions im Innern des Gels eine Änderung des Dispersitätsgrades der Farbstoffe eintreten und dadurch die Diffusionsfähigkeit des Farbstoffanions beeinträchtigen.

Die Echtfärbung der tierischen Faser kann durch beide Vorgänge hervorgerufen werden. Die Fähigkeit der tierischen Faser zur selektiven Adsorption läßt sich hiermit erklären.

Die Tatsache, daß farblose Säure eine Steigerung der Farbstoffaufnahme bewirkt, war mit der chemischen Theorie nicht zu erklären. Durch die mit der farblosen Säure herbeigeführte Proteinsalzbildung wird die Anziehung

des Farbstoffes erhöht.

ELÖD und BÖHME (10) fanden in Modellversuchen mit Wolle bestätigt, daß die Proteinsalzbildung zwischen Protein-Gel und der farblosen Säure der Aufnahme des Farbsäureanions vorausgeht. Art und Menge der gebildeten Proteinsalze sind für das Zustandekommen der Färbung entscheidend (17).

SPEAKMAN (57, 58) mißt der Quellung ausschlaggebende Bedeutung bei und bemängelt, daß ELÖD diese nicht genügend berücksichtigt habe. Der Einfluß der Quellung beruht nach ELÖD und Mitarbeitern (10, 12) lediglich darauf, daß die Geschwindigkeit der Farbstoffaufnahme vergrößert wird.

ELÖD und FRÖHLICH (11) haben auch die Frage der Bindung von sauren Farbstoffen durch Eiweiß im isoelektrischen Bereich untersucht. Hierbei dürfe der individuelle Charakter der Farbstoffe nicht außer Acht gelassen werden, da Farbstoffe, welche zu kolloiden Dispersionen neigen, zufolge ihrer Teilchengröße auch im I. P. und sogar auf der alkalischen Seite gebunden werden können. Die Bindung von sauren und substantiven Farbstoffen sei im isoelektrischen Bereich auf die Ausbildung von Wasserbrücken zwischen Faser und Farbstoffmolekül zurückzuführen.

GERSTNER (18) hat der Auffassung ELÖDS über die Farbstoffbindung zugestimmt. Auch aus den Forschungsergebnissen von VALKÓ (61) geht hervor, daß Ionenkräfte beim Färben sowohl von tierischen als auch von pflanzlichen Textilfasern die Anziehung und Anlagerung der Farbstoffe bewirken. Dabei kann es sich sowohl um Ionen im elektrochemischen Sinne handeln, wenn der betreffende Farbstoff monomolekular löslich ist, als auch um Kolloidionen, wenn der zum Färben verwendete Farbstoff assoziiert ist. Es hängt nur von der Teilchengröße ab, ob die assoziierten Farbstoffe in die bei den verschiedenen Textilfasern verschieden großen Zwischenräume im Fasergefüge einzudringen vermögen.

Da beispielsweise Zellulose nichtassoziierte Farbstoffe nicht bindet und auch zu keiner Salzbildung befähigt ist, von tierischen Fasern dagegen nichtassoziierte Farbstoffe so fest gebunden werden, daß sie nicht mehr ausgewaschen werden können, wird der Schluß gezogen (18), daß die

Farbstoffbindung auf der Bildung eines unlöslichen Salzes zwischen Anionen und Kationen beruht.

Im stark sauren Färbebad wird Wolle positiv aufgeladen und kann so als basische Substanz mit äquivalenten Mengen freier Farbstoffsulfonsäuren eine Faser-Farbstoffsäureverbindung bilden. Für eine Faser-Farbstoffsäureverbindung durch Valenzkräfte spricht auch die Tatsache, daß die Färbung von Wolle dann am besten ist, wenn alle freien Aminogruppen der Wollsubstanz stöchiometrisch mit Farbstoffsäuren reagieren(9, 10, 12, 13).

Für die Bindung der Farbstoffsäuren an Wolle ist es gleichgültig, ob die Farbstoffe monomolekular oder kolloid gelöste Ionen sind. Die Bindung der Farbstoffanionen durch die freien Aminogruppen der Wolle führen zur Bildung schwer hydrolysierbarer Verbindungen. Dabei wird die beim Färben im sauren Medium zunächst entstandene leichter hydrolysierbare Schwefelsäure-Wollverbindung durch die schwerer hydrolysierbare Farbstoffsäure-Wollverbindung verdrängt. Außerdem zeigen tierische Fasern, insbesondere Wolle, basischen Farbstoffen gegenüber ein Verhalten, das nur mit den amphoteren Eigenschaften der Eiweißkörper erklärt werden kann (18).

Nach WEBER (62) nimmt die Wolle zunächst die Wasserstoffionen der Farbstoffsulfosäure auf, die sich an die freien Aminogruppen anlagern, wodurch das Fasereiweiß elektropositiv aufgeladen wird, und die elektronegativen Farbstoffmoleküle an der Faseroberfläche gefällt werden. Beim weiteren Färben wandern dann die Farbsäureionen in das Faserinnere, wo sie die Wasserstoffionen an den freien Aminogruppen verdrängen. Um in das Faserinnere eindringen zu können, muß der Farbstoff die dichte oberflächliche Schuppenschicht überwinden. Die elektrostatische Fällung des Farbstoffes an der Oberfläche bedingt dort eine rasche Anfärbung, die aber in der Praxis sehr ungleich ausfällt. Deshalb wird durch Zusatz von Salzen zum Färbebad die Aufladung der Wollfaser herabgesetzt, wodurch die elektrostatische Farbstofffällung an der Faseroberfläche zu Beginn der Färbung vergrößert wird (egalisierende Wirkung der Salze). Die Wanderungsgeschwindigkeit des Farbstoffes wird auch durch die Temperatur weitgehend beeinflusst. Das Ende des Färbeprozesses wird um so rascher erreicht, je höher die Temperatur ist.

Bei der Wolle ist infolge der stark amorphen Faserstruktur das Eindringen der Farbstoffteilchen verhältnismäßig leicht möglich und kann noch durch Faserquellung wesentlich erleichtert werden, die durch Zusatz von anorganischen Säuren erreicht wird.

7. Grenzflächentheorie

Die beim Färbevorgang eintretende Farbstoffbindung wurde auch als Grenzflächenerscheinung gedeutet, welche wieder in engster Beziehung zu Adsorptionsvorgängen und kapillarelektischen Vorgängen steht.

Nach OSTWALD (42) ist Adsorption eine Konzentrationsverschiedenheit zwischen Bestandteilen in der Grenzfläche und dem Innern der angrenzenden Phasen. Über das Wesen der Kräfte, die zwischen dem Adsorptiv und dem Adsorbenten wirken, ist damit aber nichts ausgesagt. In der Grenzfläche zwischen zwei Phasen sind sehr verschiedenartige Energiepotentiale - Grenzflächenspannung (mechanische Energie), chemische, thermische und strahlende - möglich (65). MICHAELIS (35) mißt den elektrischen Ladungen der Oberflächen besondere Bedeutung bei. Man unterscheide nicht in dem Sinne zwischen Adsorption und chemischer Bindung, daß bei der Oberflächenwirkung, welche die Adsorption bedingt, die Mitwirkung chemischer Kräfte ausgeschlossen wäre, sondern die Adsorption sei als eine Betätigung von Valenzen aufzufassen, die vom Adsorbens aus nach außen wirken, während bei einer chemischen Reaktion der reagierende Stoff durch die ganze Masse hindurch reagiere bis zur vollkommenen Umwandlung derselben in ein neues chemisches Individuum (33).

Nach den Adsorptionsgleichungen, Adsorptionsisothermen genannt, ist die Adsorption Ausdruck eines reversiblen dynamischen Gleichgewichtes. Zunächst herrscht eine dynamische Oberflächenspannung, die dann in die statische Oberflächenspannung übergeht, wenn sich die Adsorption vollzogen hat. Wie rasch sich das Adsorptionsgleichgewicht einstellt, hängt davon ab, ob es sich um eine positive oder um eine negative Adsorption handelt. Man spricht von positiver Adsorption (Adsorption = Veränderung der Konzentration in der Oberflächenschicht), wenn die Konzentration des gelösten Stoffes in der Grenzfläche größer ist als in den beiden homogenen Phasen, von negativer Adsorption, wenn sie kleiner ist.

Die Adsorptionsgeschwindigkeit ist bei der negativen Adsorption wesentlich größer als bei der positiven. Bei der negativen Adsorption braucht nur eine verhältnismäßig kleine Zahl von Molekülen aus der dünnen Oberflächenschicht entfernt und in die Masse der Flüssigkeit eingeführt zu werden. Wohl muß sich auch die Rückdiffusion des gelösten Stoffes aus dem Innern in die Oberflächenschicht geltend machen, denn beim endgültigen Gleichgewicht hält dieses Diffusionsbestreben dem durch die Molekularkräfte bedingten Zug ins Innere die Waage.

Bei der positiven Adsorption wird infolge der Anziehung der Molekularkräfte die unmittelbar unter der Oberflächenschicht befindliche Lage der Lösung, die im Wirkungsbereich der Molekularkräfte liegt, sehr rasch an gelöstem Stoff verarmen, da dieser in die Oberflächenschicht gedrängt wird. Ist die positive Adsorption stark, so wird aber diese Menge nicht genügen. In die verarmte Schicht diffundiert dann aus dem Innern gelöster Stoff, der immer wieder rasch von der Oberflächenschicht aufgenommen wird. Dies dauert so lange, bis dicht vor dem Erreichen des Gleichgewichtes die Rückdiffusion aus der Oberfläche der Zudiffusion die Waage hält (16).

Der Begriff "Adsorption" bedeutete früher Verdichtung eines Stoffes an der Oberfläche. Häufig ist jedoch sehr schwer zu entscheiden, ob eine Anreicherung des Stoffes an der Oberfläche vorliegt oder ob dieser mehr oder weniger tief in den Adsorbenten eindringt oder diesen sogar ganz durchdringt (feste Lösung). Für alle diese Vorgänge hat sich der Ausdruck "Adsorption" eingebürgert, unter dem auch Verdichtungen an inneren Flächen verstanden werden.

Die Auffassung des Färbeprozesses als Adsorptionsvorgang beruht wesentlich auf der Tatsache, daß auch bei der Aufnahme von Farbstoffen die Beziehungen zwischen Aufgenommenem und Gelöstbleibendem der Adsorptionsisotherme entsprechen (4).

Den ersten Versuch, eine Adsorptionstheorie der histologischen Färbung aufzustellen, hat MICHAELIS (36) gemacht. Da die Farbstoffe den Substraten stets hochdispers oder kolloidgelöst angeboten werden, sind hier vor allem die Erscheinungen an der Grenzfläche vom festen Körper zum flüssigen dispersen System zu berücksichtigen. In den Mittelpunkt seiner Betrachtungen stellt MICHAELIS (36) die Adsorbierbarkeit der verschiedenen Substan-

zen. Er teilt deshalb die Adsorptive in zwei Gruppen ein, die Elektrolyte und die Nichtelektrolyte. Auch bei den Absorbentien unterscheidet er zwischen indifferenten und elektrolytartigen. Daraus ergeben sich mehrere Gruppen von Adsorptionserscheinungen:

- I. a) indifferentes Adsorbens - indifferentes Absorbendum
- I. b) indifferentes Adsorbens - elektrolytart. Absorbendum
- II. a) elektrolytart. Adsorbens - indifferentes Absorbendum
- II. b) elektrolytart. Adsorbens - elektrolytart. Absorbendum.

Als Typus der indifferenten Adsorbentien gilt die Kohle. Die indifferenten Adsorptive (Nichtelektrolyte) - sie gehören überwiegend in die organische Chemie, wie Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Ketone und Ester - werden alle von der Kohle adsorbiert, aber in verschiedenem Maße. Man kann von diesen Stoffen die Regel aufstellen, daß ihre Adsorbierbarkeit mit steigendem Kohlenstoffgehalt rasch ansteigt, mit Ausnahme der in Wasser unlöslichen Kohlenwasserstoffe. Mit steigendem Kohlenstoffgehalt in homologen Reihen fällt die Löslichkeit in Wasser, des weiteren sinkt die Oberflächenspannung der wässrigen Lösung. Den Zusammenhang zwischen Grenzflächenaktivität und Adsorbierbarkeit hat FREUNDLICH (16) schon eingehend gewürdigt, und MICHAELIS (36) stellte die erste Freundlichsche Regel auf: "Je oberflächenaktiver ein Stoff ist, um so besser wird er adsorbiert."

Die chemische Natur der Kohle oder überhaupt des Adsorbens sei ohne Belang, woraus MICHAELIS (36) die zweite Freundlichsche Regel aufstellte: "Die Adsorption ist von der chemischen Natur des Adsorbens weitgehend unabhängig", was als mechanische Adsorption zu betrachten ist.

Zunächst glaubte man, daß mit diesen beiden Regeln alle Adsorptionsvorgänge zu erklären seien. So auch die Färbung der Gewebe, wobei man das Mitwirken chemischer Affinitäten ausschließen zu können glaubte. Es zeigten sich jedoch Abweichungen von diesen Regeln. Nach der ersten Regel dürften oberflächeninaktive Stoffe nicht adsorbiert werden, und solche Stoffe, welche die Oberflächenspannung erhöhen, müßten negativ adsorbiert werden. Von der Kohle werden jedoch alle in Wasser löslichen Stoffe adsorbiert, nicht nur die Nichtelektrolyte, sondern auch die Elektrolyte, also alle Salze.

Die Adsorption von NaCl durch Kohle könnte auf verschiedene Weise erfolgen: a) Es werden gleiche Mengen Na- und Cl-Ionen adsorbiert (äquivalente

Adsorption); b) es werden etwas mehr Na- als Cl-Ionen adsorbiert oder umgekehrt, indem NaCl hydrolytisch teilweise an die Kohle etwas NaOH abgibt und freie HCl in Lösung bleibt, oder umgekehrt (hydrolytische Adsorption).

Es hat sich aber gezeigt, daß bei Kohle keine hydrolytische Adsorption vorkommt, sondern nur eine äquivalente, was auch für die Farbstoffe gilt. Solche Art von Adsorption ist apolar und reversibel. Die Adsorbierbarkeit der Elektrolyte beruht auf einer additiven Eigenschaft ihrer Ionen, und deren Adsorbierbarkeit hängt nicht vom Vorzeichen ihrer Ladung ab.

Nach den Untersuchungen von MICHAELIS (36) kann die Adsorption eines Elektrolyten an Kohle nicht als Salzbindung aufgefaßt werden. Demnach wurde auch angezweifelt, daß dem Färbeprozess chemische salzartige Bindungen zugrundeliegen. Die elektrolytartigen Adsorbentien haben lediglich die Unlöslichkeit mit der Kohle gemeinsam. Eine getrennte Betrachtung der Adsorption von Nichtelektrolyten und Elektrolyten ist daher erforderlich.

Kohle gilt für Nichtelektrolyte als das beste Adsorbens. Es gibt keinen Stoff, welcher Nichtelektrolyte annähernd so stark adsorbiert wie Kohle. Von den Elektrolyten werden die anorganischen nur schwach, hingegen Farbstoffe sehr gut adsorbiert. Nach MICHAELIS (36) zerfallen diese elektrolytartigen Adsorbentien in zwei Gruppen: Solche, die fast nur basische Farbstoffe, und solche, die fast nur saure Farbstoffe adsorbieren, wobei basische Farbstoffe von unlöslichen Säuren, saure von unlöslichen Basen festgehalten werden. Diese Beobachtungen haben auch frühere Untersucher veranlaßt, dafür chemische Reaktionen anzunehmen, der Nachweis der chemischen salzartigen Bindung wurde aber nie in einwandfreier Weise erbracht. MICHAELIS (37) hat jedoch in einem Modell mit kieselsaurem Kalk als Adsorbens und mit Methylenblau-Chlorid als Adsorptiv eine chemische Reaktion beobachten können: Kieselsaures Ca + Methylenblau-Chlorid = kieselsaures Methylenblau + CaCl_2 .

In Kaolin enthaltener Kalk ist gegen die Methylenblau-Base ausgetauscht worden. Dieser Vorgang ist nachweislich polarer Natur und die Färbung besteht in der Unlöslichkeit des entstehenden kieselsauren Methylenblaus. Neben der äquivalenten und der hydrolytischen Adsorption gibt es somit noch eine dritte Form, die Austauschadsorption. Sie besteht nur in einer

chemischen Umsetzung. Demnach sind, von der Kohle abgesehen, Farbstoffadsorptionen weitgehend von chemischen Affinitäten abhängig (37). Da hierbei der Einfluß der elektrischen Ladung offensichtlich ist, wird diese Ionenadsorption allgemein auch als "elektrische Adsorption" bezeichnet (65).

In der Histologie sind die Adsorbentien Eiweißkörper, für die rein chemische Affinitäten angenommen werden. Durch das Verhalten der Kohle und der Zellulose gegenüber Farbstoffen entstanden aber Zweifel an der chemischen Natur der Gewebsfärbungen. MICHAELIS und RONA (39) haben für die Anfärbbarkeit der Zellulose, die keine Salze bilden kann, Asche-Rückstände, wie Kieselsäure und Kalk, verantwortlich gemacht und damit nachgewiesen, daß die Färbung von Zellulose nicht mit derjenigen von Eiweiß gleichgesetzt werden kann. HEIDENHAIN (21) schloß aus seinen Modellversuchen mit Nukleinsäuren und Serumalbumin auf eine chemische salzartige Bindung der Farbstoffe an das Eiweiß. ZEIGER (65) hat diese Beobachtungen jedoch nur als Wahrscheinlichkeitsbeweis anerkannt.

Die Eiweißkörper verhalten sich als Ampholyte bei Gegenwart von Säure wie eine Base und wandern im elektrischen Feld zur Kathode und umgekehrt in Gegenwart von Lauge. Geht man allmählich von der sauren Lösung zur alkalischen über, so gelangt man zu einem p_H -Wert, bei dem das Eiweiß im elektrischen Feld nicht wandert. HARDY (19) hat dieses Phänomen als erster beschrieben und diesen ungeladenen Zustand des Eiweißes "Isoelektrischen Punkt" bezeichnet. In einem Medium genügend hoher W_k liegen die Karboxylgruppen als undissoziierte $COOH$ -Gruppen vor, die Aminogruppen als positiv geladene Ammoniumgruppen $(NH_3R)^+$. Das Gesamtmolekül trägt also positive Überschußladung. Bei absinkender W_k geben sowohl die $COOH$ -Gruppen wie die Ammoniumgruppen H -Ionen ab, und zwar jede dieser Gruppen bei der durch ihre Dissoziationskonstanten bestimmten W_k . Bei hinlänglich geringer W_k des Mediums werden also schließlich die Karboxylgruppen als negativ geladene Anionen $R-COO^-$ und die basischen Gruppen als ungeladene freie Aminogruppen $R-NH_2$ vorliegen. Das Molekül trägt dann eine negative Überschußladung. Bei fallender W_k geben zuerst die Karboxylgruppen ihr Proton ab und gehen in die anionische Form über, und erst bei höheren p_H -Werten werden die Ammoniumgruppen entladen. Das bedeutet, daß bei mittleren p_H -Bereichen sowohl die saure als auch die basische Gruppe in negativ bzw. positiv geladener

Form vorliegen. Der Zustand des Eiweißmoleküls im isoelektrischen Bereich ist also nicht der eines Neutramoleküls, sondern der eines Zwitterions (30).

Denaturierte Eiweißkörper sind in Wasser unlöslich, geben aber sowohl mit Säuren als auch mit Laugen zum Teil lösliche Salze. Salzfreies Serum-eiweiß, in stark verdünntem Zustand erhitzt, ergibt eine milchige Trübung, jedoch noch keine Flockung. Gibt man Säure zu, so tritt mit steigendem Säuregehalt immer intensivere Flockung auf bis bei einem bestimmten pH -Wert ein Maximum erreicht wird. Bei weiterem Säurezusatz lösen sich die Flocken wieder. Der Punkt, bei welchem maximale Flockung eintritt, entspricht dem I. P.. Durch Zugabe von Kupfersalz konnte MICHAELIS (36) beweisen, daß die H-Ionen für die Flockung nicht allein verantwortlich sind. Sind in einer Lösung gleichzeitig Cu^{++} - und H^+ -Ionen, so ist nur eine geringe H-Ionenkonzentration erforderlich, um die Enladung des Eiweißes zu erreichen. Das Gleiche gilt auch für ein gut adsorbierbares Anion, z.B. Jod. Durch Cu-Ionen wird also das Fällungsoptimum nach der weniger sauren Seite, durch Jod-Ionen nach der stärker sauren Seite verschoben. Beim Zugabe von Farbstoffen zur "Lösung" denaturierten Serum-eiweißes zeigte sich, daß die basischen Farbstoffe das Fällungsoptimum des denaturierten Eiweißes nach der weniger sauren Seite verschieben, die sauren Farbstoffe nach der stärker sauren Seite. Die kolloiden Eiweißkörper ziehen die sauren und basischen Farbstoffe durch eine chemische salzartige Bindung an. MICHAELIS (36) hält diesen Vorgang für eine Austauschadsorption. Nach ZEIGER (65) sind die Eiweißkolloide sowohl zur mechanischen als auch zur Austauschadsorption, aber auch zur chemischen Reaktion befähigt. Hinweise auf die Erscheinung als Austauschadsorption lassen sich nur mit nichtumladbaren, hochdispersen polaren Farbstoffen erbringen, hingegen sind die Verhältnisse bei den umladbaren Farbstoffen molekulardispers oder kolloider Größenordnung oder gar mit substantiven Farbstoffen sehr viel schwieriger zu übersehen.

II. Der Einfluß der Fixation auf die Färbbarkeit histologischer Elemente

Die Art der Fixation ist für den Ausfall histologischer Färbungen wesentlich (64). Um mit einer Färbung besonders kontrastreiche Bilder zu erhalten, werden in der Mikroskopie meist rein empirisch Fixationsmittel oder Gemische aus solchen angewandt.

Durch die Fixation sollen vor allem postmortale Veränderungen im Gewebe verhindert und die Struktur der Gewebe möglichst erhalten werden (53).

Nach SEKI (56) besteht jedoch die vordringliche Aufgabe der histologischen Fixation darin, die Gewebselemente unlöslich zu machen und die Strukturen und die Färbbarkeiten nach einer Reihe Verfahren - Durchtränkung, Einbettung, Färbung etc. - womöglich stark und deutlich hervorzuheben, also nicht darin, sämtliche Gebilde in einem dem anfänglichen Zustande möglichst getreuen Abbild festzuhalten. Es ist vielmehr so, daß im allgemeinen, je lebensreuer die Strukturen durch die Fixierung bleiben, desto undeutlicher sind sie im histologischen Präparat dargestellt.

Nach den Darlegungen über das Wesen der Färbung kommt dabei den elektrischen Ladungen der Gewebe und der Farbstoffe eine wichtige Rolle zu; bei der Farbverteilung im Substrat sind aber auch die Teilchengröße der Farbstoffe sowie die Strukturdichte der Substrate zu berücksichtigen. Es sind demnach für die Färbbarkeit histologischer Elemente zwei Momente erforderlich: ein elektrochemisches und ein mechanisches (56). Bei der Deutung von Färbresultaten ist deshalb immer zu beachten, inwieweit die Vorbehandlung, vor allem die Fixation, die Substrate bezüglich dieser beiden Faktoren beeinflußt hat.

So bewirkt Formaldehyd eine Aziditätserhöhung der Substrate und macht sie dadurch basophiler. Bichromat, Pikrinsäure und Trichloressigsäure sind sogenannte Alkaloidfällungsmittel. Sie machen speziell basische Bestandteile der Substrate unlöslich, so daß diese gemäß ihrer anfänglichen Reichhaltigkeit an basischen Substanzen mehr oder weniger stark azidophil werden. Dagegen beeinflussen stark koagulierende Fixierer die Attraktionskräfte der Substrate durch Änderung ihrer Dichtigkeit oder Porosität. Alkohol z.B. beeinflußt die Färbbarkeit der Gewebe im elektrochemischen

Sinne nur wenig, ändert jedoch die Nuance der Färbung, indem er eine Schrumpfung der Gewebe und eine Auflösung gewisser Substanzen hervorruft (56).

Die meisten Fixierungsflüssigkeiten reagieren mehr oder weniger stark sauer, was für die Fällung von Gewebssubstanzen notwendig ist. Die sauren Fixierer machen aber keineswegs alle Substanzen unlöslich, eine gewisse Menge geht auch in Lösung. Bei der Fixierung der Hodenzellen von Salamandern mit Chromsäure beobachtete TELLYESNICZKY (60) eine fast vollkommene Auflösung des Zytoplasmas. Auch Formalin-, Pikrinsäure-, Sublimat- und Alkoholpräparate zeigten ähnliche Veränderungen. Dagegen blieb bei Fixierung mit Osmiumsäure und Kaliumichromat die Masse der Zelle gut erhalten, weshalb TELLYESNICZKY diese Substanzen als vorzügliche Plasmakonservierer bezeichnet.

Die Frage des Herauslösen von Eiweiß wurde bisher neben den sehr betonten Schrumpfungen und Quellungen kaum gewürdigt. Die Untersuchungen von TELLYESNICZKY haben gezeigt, daß die ungünstigen Resultate der Fixation zum großen Teil auf einem Herauslösen von Eiweiß beruht, worauf auch die Schrumpfungen zurückzuführen sind. REGAUD und POLICARD (51) unterscheiden zwischen einer "fixation morphologique" und einer "fixation de substances". Die histologischen Elemente enthalten eine Menge sowohl bekannter als auch unbekannter chemischer Substanzen, welche in einer mehr oder weniger bestimmten Form oder Struktur lokalisiert oder diffus verteilt vorliegen. Die gebräuchlichen Fixationsmittel erhalten gewisse dieser Substanzen, indem sie dieselben unlöslich machen, während andere im Verlauf der auf die Fixation folgenden Behandlung aus dem Gewebe entfernt werden (51).

ZEIGER (64) verglich die nach Alkoholfixation ermittelten I. P. bestimmter Gewebelemente mit denen nach anderen Fixationen und konnte nachweisen, daß bestimmte Fixationsmittel den I. P. eines bestimmten Gewebeelementes oder mehrerer Gewebeelemente desselben Organs in konstanter und typischer Weise verschieben. Nicht immer erfolgt jedoch die Verschiebung des I. P. für alle Gewebeelemente eines Organs bei gleichartiger Fixation in gleichem Sinne und in genau gleicher Intensität. Solche Unterschiede müssen auf die verschiedene Reaktionsfähigkeit der untersuchten Substrate gegenüber dem Fixationsmittel zurückgeführt werden. Die Ladungsverhältnisse der Gewebeelemente werden durch Fixierungsmittel, die gleich gute Färbbarkeit wie Alkohol ergeben, weniger verändert, als durch solche, von denen schon empirisch eine spezifische Änderung der allgemeinen Färbbarkeit bekannt ist.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Für den histometrischen Nachweis kollagener Substanzen in gekochten Würsten hat sich die Azanfärbung nach HEIDENHAIN in der Modifikation nach KOTTER und Mitarbeitern (22, 23, 24, 26) bewährt. Dabei wird bewußt auf eine Kernfärbung verzichtet. (Die morphologische Auswertung soll mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgen.)

Zunächst werden 0,5 cm dicke Brühwurstblöcke 24 Stunden in Müllersche Flüssigkeit eingelegt. Nach einstündiger Wässerung der Blöcke werden 10 μ dicke Gefrierschnitte hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und bei Zimmertemperatur 12 bis 24 Stunden getrocknet. Die Schnitte werden 3 Minuten lang in Anilinblau-Orange-Eisessig (0,5 g Anilinblau wasserlöslich⁺, 2 g Orange G⁺⁺) auf 100 ml Aqua dest., 5 ml Eisessig, aufkochen und filtrieren nach Erkalten) gefärbt. Die kollagene Substanz ist dann blau und das Muskeleiweiß gelb dargestellt.

Da diese Färbung bei der histometrischen Kollagenbestimmung in Wurst verwendet wird und an Hand dieser Ergebnisse zu entscheiden ist, welcher Qualitätsstufe die betreffende Wurst der Zusammensetzung nach angehört oder ob sie sogar als verfälscht zu beurteilen ist, muß zuerst einmal die strenge Spezifität der Färbemethode gesichert sein.

⁺) Das Anilinblau wasserlöslich ist ein Gemenge der Na-, Ammonium- oder Ca-Salze von Di- und Trisulfosäuren des Triphenylpararosanilin. Die Stellung der Sulfogruppen ist nicht mit Sicherheit bekannt. Die Konstitution ist grundsätzlich dieselbe wie beim Methylenblau.

⁺⁺) Das Orange G gehört zur großen Gruppe der Azo-Farbstoffe. Es ist ein saurer Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 452,4 und der Summenformel $C_{16}H_{10}O_7N_2S_2Na_2$ (20).

I. Der Einfluß verschiedener Fixierungsmittel und verschiedener p_H -Werte der Farblösung auf die Färbbarkeit kollagener und nicht kollagener Eiweißkörper

In orientierenden Untersuchungen wurde geprüft, ob neben der bisher verwendeten Müllerschen Flüssigkeit auch andere Fixierungsmittel für eine differenzierte Anfärbung von verleimten und von rohem Kollagen sowie von koaguliertem Muskelbrei geeignet sind. Die verschieden fixierten Eiweiß- und Gewebeteile wurden bei verschiedenen p_H -Werten gefärbt, um die für die Färbung jeweils günstigsten p_H -Bereiche zu erfassen. Neben Gelatine wurden rohe Schwarten und Sehnen sowie zusammenhängend koagulierte Muskeleiweiß verwendet.

Gelatinepulver wurde 20 %ig in warmen Wasser gelöst und von dem Erstarrten Blöcke von der ungefähren Größe 2 x 1 x 0,5 cm herausgeschnitten. Sehnen und Schwarten wurden in Stückchen von 3 bis 5 mm Dicke verwendet. Die Muskulatur wurde mit gleichen Teilen Wasser und mit 3 % NaCl, die Gesamtmasse versetzt und fein zerkleinert; die Koagulation wurde durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 80° C herbeigeführt. Davon wurden ebenfalls Stücke von der Größe 2 x 1 x 0,5 cm vorbereitet.

Folgende Fixierungsflüssigkeiten wurden verwendet:

1. Müllersche Flüssigkeit; Fixierungsdauer 24 Stunden,
Wässern 1 Stunde;
2. Orths Gemisch; 9 Teile Müllersche Flüssigkeit,
1 Teil Formol (40 %, 1 : 4),
Fixierungsdauer 48 Stunden,
Wässern 24 Stunden;
3. B-15; 75 ml gesättigte wäßrige Pikrinsäure, 25 ml chemisch reines Formol, 5 ml Eisessig, dieses Gemisch geschlossen auf 38° C erwärmen, 1,5 g dunkelrote Chromsäurekristalle, 2,0 g kristalliner Harnstoff,
Fixierungsdauer 2 Stunden bei 38° C, 24 Stunden in 70 %igem Alkohol, 2-3 mal wechseln,
Wässern 2 Stunden;

4. Sulfosalicylsäure; 100 ml absoluter Alkohol,
3 g Sulfosalicylsäure,
5 ml Eisessig,
Fixierungsdauer 24 Stunden,
absoluter Alkohol 24 Stunden,
Wässern 2 Stunden;
5. Formol (40 %ig) 1 : 4;
Fixierungsdauer 24 Stunden,
Wässern 24 Stunden;
6. Trichloressigsäure (10 %ige wässrige Lösung);
Fixierungsdauer 24 Stunden,
absol. Alkohol 24 Stunden,
Wässern 2 Stunden;
7. Harnstoff (20 %ige wässrige Lösung);
Fixierungsdauer 48 Stunden,
Wässern 12 Stunden;
8. Salyrgan-Natrium (1 %ige wässrige Lösung);
auf Objektträger aufgezogene Schnitte 1 Stunde fixieren, mit Aqua dest.
kurz abwaschen, trocknen;
9. Benzaldehyd; Fixierungsdauer 6 Tage,
96 %iger Alkohol, 3-mal
wechseln, 24 Stunden,
Wässern 3 Stunden;

Die Farblösungen hatten folgende Zusammensetzung und p_H -Werte:
Als Stammlösung diente 0,5 g Anilinblau + 2 g Orange G in 100 ml
Aqua dest. (p_H 6, 9). Davon wurden folgende Gebrauchslösungen hergestellt:

- | | |
|--|------------|
| 1. 25 ml Stammlsg. + 0,2 ml Eisessig + 25 ml Puffer ⁺⁾ | p_H 5, 7 |
| 2. 25 ml Stammlsg. + 0,4 ml Eisessig + 25 ml Puffer | p_H 4, 5 |
| 3. 25 ml Stammlsg. + 0,8 ml Eisessig + 25 ml Puffer | p_H 4, 1 |
| 4. 25 ml Stammlsg. + 2,0 ml Eisessig + 25 ml Puffer | p_H 3, 8 |

⁺⁾ Als Puffer wurde der Azetat-Veronal-Puffer nach MICHAELIS (38)
verwendet.

5. 25 ml Stammlsg. + 2,0 ml Eisessig + 10 ml Puffer
+ 15 ml Aqua dest. p_H 3,2
6. 25 ml Stammlsg. + 2,0 ml Eisessig + 25 ml Aqua dest. p_H 2,5

Sämtliche Schnitte wurden ca. 12 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet, nachdem sich gezeigt hatte, daß Unterschiede in der Färbbarkeit bei Trocknungszeiten von 1,6 und 24 Stunden nicht auftraten.

Besprechung der Ergebnisse:

Der koagulierte Muskelbrei zeigte nach den verschiedenen Fixierungen meist eine starke Affinität zum Orange. Bei p_H 2,5, dem p_H , der auch die gebräuchliche Farblösung aufweist, war sie am stärksten, wobei die Farbstoffdichte eine gelbbraune Farbe auftrat. Mit steigendem p_H -Wert wurde die Färbung des Muskeleiweißes hellgelb. Lediglich das in Formol fixierte Material zeigte eine grüne Mischfarbe.

Wesentlich unterschiedlicher waren die Ergebnisse bei rohem Kollagen und bei Gelatine. In Trichloressigsäure und in Harnstoff löste sich die Gelatine auf. Die in Orths Gemisch, Salyrgan-Natrium und Benzaldehyd fixierte Gelatine war ebenso wie nach Fixierung in Müllerscher Flüssigkeit nach Färbung bei p_H 2,5 kräftig blau. Mit steigendem p_H in der Farblösung verliert die Gelatine rasch ihre Affinität zu Anilinblau und bindet an Stelle dessen Orange. Der Übergang zur Gelbfärbung tritt bei Benzaldehyd-Fixierung erst bei p_H 4,5 und bei unfixierter Gelatine sogar erst bei p_H 5,7 auf. Nach Fixierung in Sulfosalicylsäure, Formol und B-15 liegt allerdings schon bei p_H 2,5 eine olivgrüne Mischfärbung vor, die mit steigendem p_H in Gelb übergeht.

Das rohe Kollagen verhielt sich gegenüber den Fixierungsmitteln anders als die Gelatine und zeigte auch andere Affinitäten zu den Farbstoffen. Von Trichloressigsäure und von Harnstoff wurde es nicht aufgelöst. Sehnen und Schwarten zeigten auch unterschiedliche Ergebnisse. Während rohe Sehnen nach Trichloressigsäure- und Benzaldehyd-Fixierung bei p_H 2,5 eine Blaufärbung zeigten, war bei rohen Schwarten nur nach Formol-Fixierung bei p_H 2,5 eine solche zu beobachten, und nach Fixierung in Müllerscher Flüssigkeit, B-15, Trichloressigsäure, Salyrgan-Natrium und Benzaldehyd trat bei diesen nur ein leichter Blauton bei p_H 4,5 und bei p_H 5,7 auf. In allen anderen Fällen waren die roh fixierten Kollagenteile gelb gefärbt.

Wie die vorliegenden orientierenden Versuche zeigen, ist durch die geprüften Fixierungsmittel keine bessere Farbaffinität des Kollagens für Anilinblau zu erzielen als mit Müllerscher Flüssigkeit. Insbesondere war mit keinem der Fixierungsmittel eine gleichmäßige Farbstoffbindung in rohem und verleimten Kollagen herzustellen, so daß auf diesem Wege eine gleiche Anwendung der Anilinblau-Orange-Färbung für gekochte und rohe Fleischmenge ohne besondere Vorbehandlung der rohen Fleischwaren nicht möglich ist.

II. Der Einfluß von HCl auf Quellung und Färbbarkeit kollagener Gewebe (Schwarten und Sehnen)

Um auch bei rohem Kollagen die gewünschte Affinität für Anilinblau zu erreichen, wurde das Kollagen in Salzsäure verschiedener Konzentrationen bei 37^o C zur Quellung gebracht. Hierfür wurden frische Schwarten und Sehnen, mit 10 %iger Nitritpökelsalz-Lake gepökelte und mit NaCl trocken gepökelte Schwarten und Sehnen verwendet.

Nach 17-tägiger Naßpökelung hatten die Schwarten 38,5 % und die Sehnen 46 % ihres Anfangsgewichtes zugenommen, während bei Trockenpökelung die Schwarten 1,1 % und die Sehnen 0,9 % ihres Anfangsgewichtes verloren haben.

Schwarten- und Sehnenstücke von ca. 1 bis 2 g wurden in n/10, n/2 und n/1 HCl eingelegt und jeweils 1, 2, 3, 5, 10 und 20 Tage im Brutschrank bei 37^o C belassen.

Vor dem Einlegen und nach dem Herausnehmen wurden die Stücke gewogen, um an Hand der Gewichts differenzen auf eine Quellung oder Entquellung schließen zu können.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1 : Änderung des Gewichtes und der Affinität zu Anilinblau von rohem Kollagen durch Salzsäure.

Lfr. Nr.	Kollagenart	Vorbehand- lung	HCl Konz.	Dauer der HCl- Einwirkung bei 37° C in Tagen	Gewichtsdiff. in % des Anfangsgewichtes	Färbung mit Anilinblau - Orange	Konsistenz und Beschaffenheit
1	Schwarten	keine	n/10	1	+ 47	blau	gequollen, fest
2			n/2		- 50	blau	brüchig, wie verkocht
3			n/1		- 53	blau	teigig
4	Schwarten	keine	n/10	2	+ 82	blau	fest, elastisch
5			n/2		- 30	blau mit grünl. Farb.	zwischen den Fingern zu zerreiben
6			n/1		--	--	völlig zerfallen
7	Schwarten	keine	n/10	3	+ 15	blau	fest, elastisch
8			n/2		--	--	bei geringstem Druck zerfallend
9			n/1		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
10	Schwarten	keine	n/10	5	+ 17	blau	noch zusammenhaltend
11			n/2		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
12			n/1		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
13	Sehnen	keine	n/10	1	+ 77	braun	gequollen, fest
14			n/2		- 31	dunkelgrün	klebend
15			n/1		- 34	braun mit blau	teigig

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Kollagenart	Vorbehandlung	HCl-Konz.	Dauer der HCl-Einwirkung bei 37° C in Tagen	Gewichtsdiff. in % des Anfangsgewichtes	Färbung mit Anilinblau-Orange	Konsistenz und Beschaffenheit
16	Sehnen	keine	n/10	2	+ 15	blau	fest, elastisch
17			n/2		+ 0	braun mit blau	Oberfläche schmierig
18			n/1		- 14	braun	brüchig
19	Sehnen	keine	n/10	3	+188	blau mit braun	fest, elastisch
20			n/2		- 2, 6	blau	brüchig
21			n/1		- 5	braun	brüchig, klebend
22	Sehnen	keine	n/10	5	+100	blau	Oberfläche schmierig
23			n/2		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
24			n/1		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
25	Schwarten	naß gepö-gelt	n/10	1	+ 4, 5	blau	gering verhärtet
26			n/2		-17	olivgrün	brüchig
27			n/1		- 4, 5	gelb-braun	brüchig
28	Schwarten	naß gepö-	n/10	2	+ 6	blau	derb, elastisch
29			n/2		-40	blau	bei leichtem Druck zerfallend
30			n/1		- 8	blau	bei leichtem Druck zerfallend

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Kollagenart	Vorbehand- lung	HCl- Konz.	Dauer der HCl- Einwirkung bei 37° C in Tagen	Gewichtsdiff. in % des An- fangsgewichtes	Färbung mit Anilinblau- Orange	Konsistenz und Beschaffenheit
31	Schwarten	naß gepö- kelt	n/10	3	- 30	blau	derb, elastisch
32			n/2		- 77	blau	teigig
33			n/1		- 36	braun	teigig
34	Schwarten	naß gepö- kelt	n/10	5	- 74	blau	brüchig, klebend
35			n/2		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
36			n/1		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
37	Sehnen	naß gepö- kelt	n/10	1	+ 43	braun	Herausnehmen gering verhärtet
38			n/2		+ 0	braun	brüchig
39			n/1		- 9	braun	brüchig
40	Sehnen	naß gepö- kelt	n/10	2	+ 17	olivgrün	derb elastisch, klebend
41			n/2		+ 0	braun	bei leichtem Druck zerfallend
42			n/1		+ 0	braun	bei leichtem Druck zerfallend

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Kollagenart	Vorbehandlung	HCl-Konz.	Dauer der Einwirkung bei 37° C in Tagen	HCl-Gewichtsdiff. in % des Anfangsgewichtes	Färbung mit Anilinblau-Orange	Konsistenz und Beschaffenheit
43	Sehnen	naß gepökelt	N/10	3	+ 50	braun	derb elastisch
44			n/2		- 1,5	braun	elastisch
45			n/1		- 5,5	braun	teigig
46	Sehnen	naß gepökelt	n/10	5	+ 32	blau	derb elastisch
47			n/2		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
48			n/1		--	--	zerfällt beim Herausnehmen
49	Schwarten	trocken gepökelt	n/10	1	+ 33	blau	gering verhärtet
50			n/2		+ 5,5	olivgrün	brüchig
51			n/1		+ 6	olivgrün	Oberfläche schmierig
52	Schwarten	trocken gepökelt	n/10	2	+ 78	blau	derb elastisch
53			n/2		+ 39	braun	Oberfl. schmierig
54			n/1		+ 39	braun	Oberfl. schmierig
55	Schwarten	trocken gepökelt	n/10	3	- 18	blau	elastisch
56			n/2		- 55	olivgrün	teigig
57			n/1		- 25	braun	teigig, brüchig

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Kollagenart	Vorbehandlung	HCl-Konz.	Dauer der HCl-Einwirkung bei 37° C in Tagen	Gewichtsdiff. in % des Anfangsgewichtes	Färbung mit Anilinblau-Orange	Konsistenz und Beschaffenheit
58	Schwarten	trocken	n/10	5	- 40	blau	weich, elastisch
59		gepökelt					
60			n/2		- 53	blau	teigig
			n/1		--	--	grob zerfallen
61	Sehnen	trocken	n/10	1	+ 60	braun	gering verhärtet
		gepökelt					
62			n/2		+ 15	braun	brüchig
63			n/1		+ 6	braun	Oberfl. schmierig
64	Sehnen	trocken	n/10	2	+206	olivgrün	deib, elastisch
		gepökelt					
65			n/2		+ 19	braun	muskelarartig
66			n/1		+ 19	braun	Muskelarartig
67	Sehnen	trocken	n/10	6	+104	olivgrün	elastisch
		gepökelt					
68			n/2		+ 19	olivgrün	Oberfl. schmierig
69			N/1		+ 13,5	olivgrün	Oberfl. schmierig
70	Sehnen	trocken	n/10	5	+136	blau	elastisch, klebend
		gepökelt					
71			n/2		- 13	olivgrün	brüchig
72			n/1		--	--	zerfällt beim Herausnehmen

Bei sämtlichen Schwarten- und Sehnenstücken, welche 10 und 20 Tage im Brutschrank waren, war das Zurückwiegen und das anschließende histologische Aufarbeiten nicht möglich, da die Stücke völlig zerfallen waren.

Besprechung der Ergebnisse:

Aus den Färbungsergebnissen ist zu ersehen, daß im allgemeinen bei Schwarten die Affinität zum Anilinblau rascher erreicht wurde als bei Sehnen. Die Quellung (Gewichtszunahme) ist in $n/10$ HCl am stärksten und bei dieser niederen HCl-Konzentration wird auch die relativ beste Affinität für Anilinblau erreicht.

Die negativen Gewichts differenzen dürften nicht auf eine Entquellung zurückzuführen sein, sondern im wesentlichen auf ein Inlösunggehen von Eiweiß. Deshalb ist in diesen Fällen auch die Affinität für Anilinblau in gewissem Umfange erhalten.

Die Versuche zeigen, daß durch Einlegen von kollagenem Material in HCl die Affinität für Anilinblau gesteigert werden kann. Diese Affinitätssteigerung ist jedoch nicht einheitlich. Außerdem würde bei unkontrollierbarem Inlösunggehen von kollagener Substanz eine quantitative Erfassung fragwürdig sein. Der Gedanke von PRÄNDL (47), die Affinität des rohen Kollagens für Anilinblau durch eine mehrstündige Behandlung mit HCl zu sichern, kann deshalb nicht weiter verfolgt werden.

III. Der Einfluß von NaCl auf die Färbbarkeit von Gelatine mit Anilinblau-Orange

Versuch II zeigte, daß die Affinität des gepökelten Materials für Anilinblau nicht so gut ist wie bei frischen Schwarten und Sehnen.

Da in Wurstwaren immer eine gewisse Menge Kochsalz enthalten ist, ist zu prüfen, inwieweit die Farbstoffbindung in Gelatine durch NaCl-Zusatz beeinträchtigt wird.

Gelatineblöcke von 0,5 cm Dicke wurden 24 Stunden in 15, 10, 5 und 1 %ige NaCl-Lösung sowie in Aqua dest. eingelegt. Gleichzeitig wurden 2, 5, 10 oder 15 % Kochsalz zu flüssiger Gelatine gegeben und 24 Stunden

stehen gelassen, Dann wurden Gefrierschnitte hergestellt, bei Zimmertemperatur getrocknet und mit Anilinblau-Orange-Eisessig-Lösung gefärbt.

Während der ganzen histologischen Aufbereitung wurde die Gelatine in Lösungen gleicher Salzkonzentrationen gehalten. Auch die Farblösungen enthielten Kochsalz in den entsprechenden Mengen.

Besprechung der Ergebnisse:

Die in Aqua dest. eingelegte Gelatine war kräftig blau gefärbt. Mit steigender NaCl-Konzentration ging die Blaufärbung zurück. Bei 15 %iger NaCl-Konzentration in der Gelatine haben sich die Gelatineschnitte leicht olivgrün gefärbt.

Die Gelatine, die in flüssigem Zustand 10 und 15 % NaCl zugesetzt erhielt, ist nicht erstarrt, sondern war nach 24 Stunden eine fadenziehende klebrige Masse, die nicht geschnitten werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß die Farbstoffaffinität des Untersuchungsmaterials durch den relativ niederen NaCl-Gehalt im Wurstgut kaum beeinflusst wird. Dazu kommt, daß im Verlauf der histologischen Aufbereitung auch noch ein wesentlicher Teil der Salze herausgelöst wird.

IV. Quellungsversuche mit Gelatine-Pulver

Es soll geprüft werden, inwieweit NaCl- und Formalin-Lösungen verschiedener Konzentrationen die Quellung von Gelatine-Pulver beeinflussen.

Der vorhergehende Versuch zeigte, daß mit steigendem NaCl-Zusatz zu Gelatine deren Affinität zu Anilinblau abnahm. Ist nun dieser Affinitätsrückgang durch eine Schrumpfung der Gelatine bedingt, wodurch das Anilinblau nicht mehr in diese einzudringen vermag oder wird durch das NaCl die elektrochemische Beschaffenheit der Gelatine verändert?

Aus Versuch I ergibt sich die gleiche Frage für die Wirkung des Formalins.

Zur Messung der Quellung wurde die Volumenmethode angewendet (56). Eine abgewogene Menge Gelatine-Pulver wurde in Meßzylinder gleicher

Querschnitte gegeben, Flüssigkeit zugesetzt, jede halbe Stunde umgerührt und nach bestimmten Zeiten das Quellvolumen abgelesen.

1. Quellung von Gelatine-Pulver in NaCl-Lösungen

Zu 1 g Gelatine-Pulver wurden jeweils 200 ml 1, 2, 3, 5 und 10 %ige NaCl-Lösung oder Aqua dest. zugegeben. 4 Stunden und 22 Stunden nach dem Ansetzen wurde das Quellvolumen abgelesen.

Die Höhe der Gelatine in Aqua dest. nach 4 Stunden Quellung wurde gleich 100 % gesetzt und die verschiedenen Quellungen der übrigen Ansätze darauf bezogen.

Der Versuch wurde 3-mal durchgeführt. Die in Tab. 2 und Abb. 1 angegebenen Werte sind arithmetische Mittel aus den Versuchswerten.

Tabelle 2: Quellvolumen von Gelatine in Abhängigkeit von der Kochsalzkonzentration.

		Aqua. dest.	NaCl - Konzentration				
			1 %	2 %	3 %	5 %	10 %
Quell- volu- men nach	4 ^h	100 %	108,5 %	106,3 %	112,8 %	117 %	138,3 %
	22 ^h	121,4 %	119 %	121,2 %	129,6 %	138,3 %	161,4 %

Um für die Streuung der Quellvolumina einen gewissen Anhaltspunkt zu bekommen, wurden die Quellhöhen in 6 Meßzylindern bei 3 %iger NaCl-Konzentration gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt.

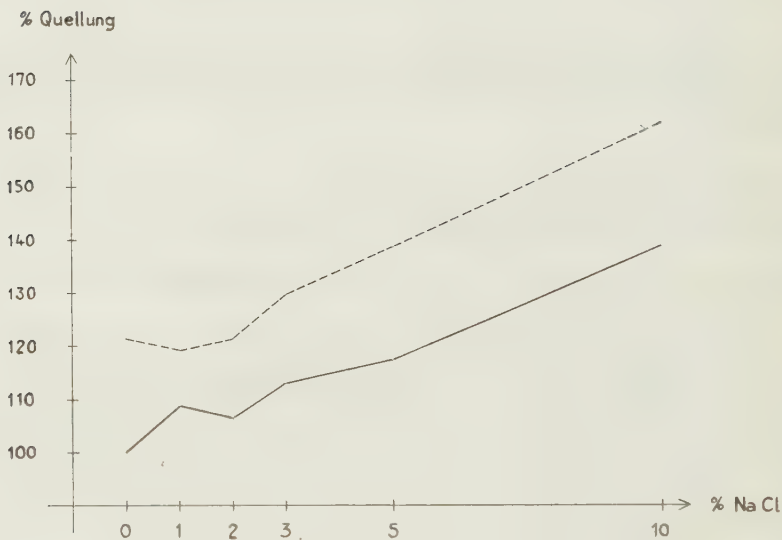


Abb. 1 Einfluß von NaCl-Konzentration und Einwirkungsdauer auf den Quellungszustand von Gelatine.
(1 g Gelatine-Pulver in 200 ml NaCl-Lösung)

————— Quellung nach 4 Stunden,
----- Quellung nach 22 Stunden.

Tabelle 3: Quellvolumen von Gelatine bei 3 %iger NaCl-Konzentration

		Zylinder - Nr.						Mittelwert
		1	2	3	4	5	6	
Quell-	4 ^h	100 %	112 %	104 %	110 %	108 %	108 %	107 %
volu-								
men	22 ^h	117 %	125 %	121 %	125 %	125 %	129 %	124 %
nach								

2. Quellung von Gelatine-Pulver in Formalin-Lösungen

Die Versuchsanordnung ist die gleiche wie im vorhergehenden Versuch. Zu 1 g Gelatine-Pulver wurden jeweils 200 ml 1, 2, 5, 10, 20 %ige Formalin-Lösung oder Aqua dest. zugegeben. Die Ablesungen erfolgten nach 4, 8 und 26 Stunden.

Tabelle 4: Quellvolumen von Gelatine in Formalin-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

		Aqua dest.	Formalin-Konzentration				
			1 %	2 %	5 %	10 %	20 %
Quell-	4 ^h	100 %	91,6 %	79 %	62,5 %	50 %	41,5 %
volu-	8 ^h	121 %	91,6 %	79 %	50 %	50 %	41,5 %
men	26 ^h	121 %	87,5 %	75 %	41,5 %	41,5 %	33,3 %
nach							

Besprechung der Ergebnisse:

Mit steigender NaCl-Konzentration nimmt auch die Quellung der Gelatine zu. Die Beeinflussung der Affinität der Gelatine zu Anilinblau durch NaCl dürfte demnach elektrochemischer Natur sein, während durch Formalin offenbar die Struktur der Gelatine verdichtet wird, also ein mechanischer Vorgang im Vordergrund liegen dürfte. Das Phänomen bei NaCl-Anwendung deutet auch an, daß die Beziehungen zwischen Gelatine und Anilinblau auf keinen Fall nur physikalischer Natur sind.

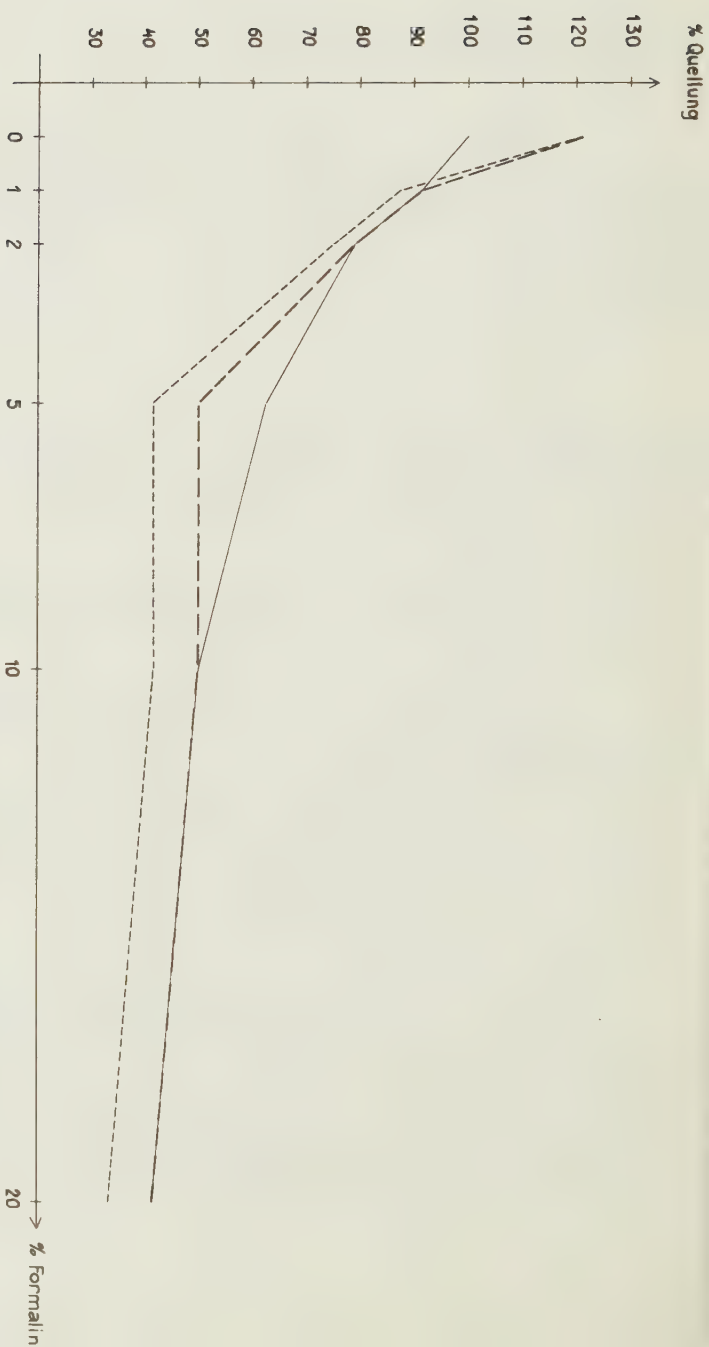


Abb. 2 Einfluß von Formalin-Konzentration und Einwirkungszeit auf den Quellungszustand von Gelatine.
(1 g Gelatine-Pulver in 200 ml Formalin-Lösung)

— Quellung nach 4 Stunden,
 - - - Quellung nach 8 Stunden,
 - - - Quellung nach 22 Stunden.

V. Diffusionsversuche mit den Farbstoffen "Anilinblau wasserlöslich" und "Orange G"

Bei der Farbenelektion aus Farbstoffgemischen kommt dem Diffusionsvermögen der Farbstoffe eine bedeutende Rolle zu. Unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten erlauben, auf einen relativen Größenunterschied der Farbstoffmoleküle zu schließen. Es ist bekannt, daß das Anilinblau-Molekül etwa 4-fach so groß ist als das Orange G - Molekül (65). Der folgende Versuch soll noch einmal zeigen, wie sich die beiden Farbstoffe in ihrem Diffusionsvermögen unterscheiden, um daraus auf relative Größenverhältnisse der beiden Farbstoffanionen schließen zu können:

0,5 g Anilinblau wurde in 100 ml Aqua dest. mit 5 ml Eisessig angesetzt und 2,0 g Orange G in 100 ml Aqua dest. mit 5 ml Eisessig. Als Diffusionsflüssigkeit wurde isotonische Essigsäure verwendet.

Die Versuche wurden in einer Scherzelle aus Quarz angesetzt, wodurch ein einwandfreies Übersichten der Farblösung mit der Diffusionslösung gewährleistet war. Die Diffusionsstrecke der Farbstoffe wurde in bestimmten Zeitabständen gemessen.

Die Versuche wurden 4-mal durchgeführt. Die in der Tabelle 5 und Abb. 3 angegebenen Werte sind Mittelwerte.

Tabelle 5: Diffusionsstrecke der Farbstoffe nach verschiedenen Diffusionszeiten.

Minuten	Diffusionsstrecke in mm	
	Anilinblau	Orange G
15	1,2	2,3
30	1,9	3,8
45	2,5	4,6
60	2,9	5,1
90	3,7	6,7
120	4,3	7,6
150	4,9	8,5
180	5,6	9,2
210	5,9	9,8
240	6,3	10,2
270	6,8	11,2
300	7,4	11,7

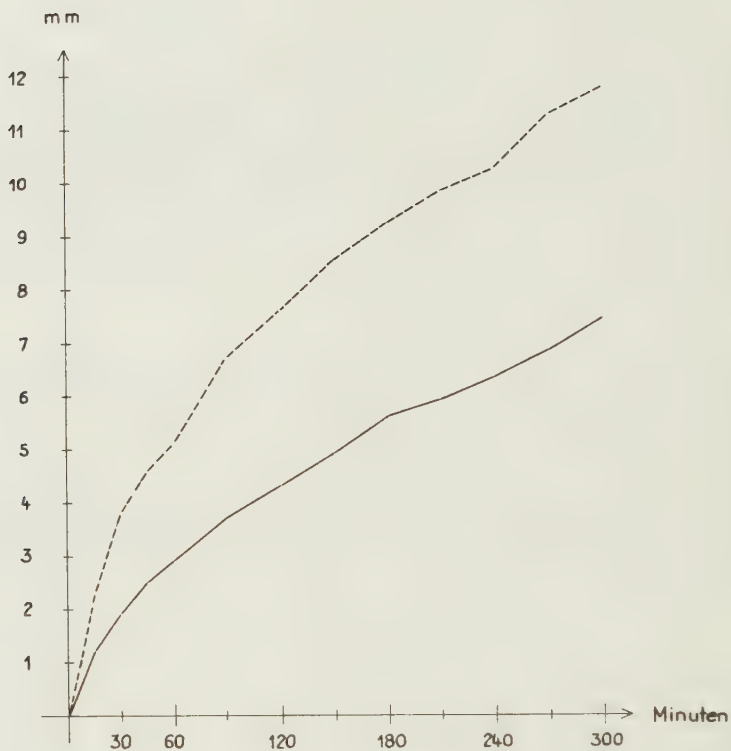


Abb. 3 Diffusionsgeschwindigkeit von
"Anilinblau wasserlöslich" (———)
und "Orange G" (-----) in isotonischer Essigsäure.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ist das Farbstoffanion des Anilinblau wesentlich größer als das des Orange G.

VI. Farbstoffentzug durch Wässern

In diesem Versuch soll geprüft werden, inwieweit den Schnitten durch Wässern die Farbstoffe entzogen werden können, um zu sehen, welche Kräfte die Farbstoffe an das Substrat binden.

Die Schnitte wurden wie üblich gefärbt und folgendermaßen weiterbehandelt: Nach dem Färben wurden sie

- a) gleich in fließendes Wasser gegeben;
- b) durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt und dann gewässert;
- c) durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt, kurze Zeit in Xylol eingestellt und dann gewässert.

Besprechung der Ergebnisse:

Bei den Schnitten, die unmittelbar nach dem Färben gewässert wurden, war nach 5 Stunden das Orange G restlos ausgewaschen, die kollagenen Bestandteile waren noch schwach blau gefärbt. Nach weiteren 2 Stunden war aber auch keine Blaufärbung mehr festzustellen.

Bei den Schnitten, welche die Alkoholreihe durchlaufen hatten und bei denen, welche auch noch mit Xylol durchtränkt worden waren, war nach 9 Stunden das Orange G restlos entfernt und nach einer weiteren Stunde auch das Anilinblau. Eine durch das Xylol bedingte längere Farbhafung konnte nicht festgestellt werden.

Die Möglichkeit der vollständigen Entfernung der Farbstoffe spricht dafür, daß die Bindung des Orange G an Muskeleiweiß und die des Anilinblau an Kollagen nicht durch eine streng chemische Reaktion bedingt ist, sondern überwiegend physikalischer Natur ist.

D. DISKUSSION

Für die Farbenelektion aus Gemischen von sauren Farbstoffen macht v. MÖLLENDORFF (41) ausschließlich physikalische Eigenschaften der Farbstoffe und der zu färbenden Substrate verantwortlich. Die Farbenelektion sei einmal durch die unterschiedliche Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe und zum anderen durch die unterschiedliche Strukturdichte der Substrate bedingt. Zur Farbhafung als solcher äußert sich v. MÖLLENDORFF nicht.

Die Färbungsintensität eines sauren Farbstoffes wird durch Zusatz einer farblosen Säure erhöht. Einige Autoren (41, 44, 55) machen hierfür eine Dispersitätsänderung, und zwar eine Dispersitätsverminderung des sauren Farbstoffes verantwortlich. PISCHINGER (46) konnte jedoch zeigen, daß in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration die Dispersität der Farbstoffe nicht beeinflußt wird, daß vielmehr das Adsorptionsvermögen der Substrate eine Änderung erfährt. Nach ELÖD und SILVA (12) bewirkt die zur Farbflotte hinzugefügte farblose Säure durch Proteinsalzbildung eine ungleiche Verteilung des Farbstoff-Anions und erhöht somit die durch rein chemische Bindung aufgenommene Menge des Farbstoffes. Darüber hinaus erleichtert die Gegenwart von Säure das Eindringen des Farbstoffes.

Die Ergebnisse aus den eigenen Versuchen mit Farblösungen verschiedener p_H -Werte lassen sich mit dieser Theorie zwanglos erklären: Es hat sich gezeigt, daß die intensivste Anfärbung bei dem niedersten p_H -Wert erfolgte.

Bemerkenswert ist die unterschiedliche Anfärbbarkeit von verleimtem und rohem Kollagen. Während Gelatine ausschließlich Anilinblau gebunden hat, wurde das unverleimte Kollagen vorwiegend von Orange angefärbt oder zeigte Mischfarben.

Nach KÜNTZEL (29) ist der Primärvorgang bei der Verleimung des Kollagens eine Schmelze des durchhydratisierten Molekülgitters, wobei die Fadenmoleküle eine gewisse Freiheit gewinnen und sich unter Faltung und Einrollung kontrahieren. Die Gestalt, welche ein Kettenmolekül in freier Lösung einnimmt, ist nicht eindeutig bestimmt; sie ist die, die nach den Gesetzen der Statistik am wahrscheinlichsten ist. Die Tendenz von gittermäßig festgelegten Molekülen, unter Deformierung einen Zustand der geringsten Ordnung

und der gleichmäßigsten Verteilung anzunehmen, ist der Ausdruck für eine Entropie-Zunahme. (Entropie: Maß für atomare und molekulare Unordnung; sie hat niedrigere Werte bei starren Kristalloiden, höhere bei Flüssigkeiten, die höchsten bei Gasen (50).)

Nach AMES (1) sind Gelatine und Kollagen in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch. Die Umwandlung von Kollagen in Gelatine erfolgt durch Behandlung mit Lauge oder Säure, wodurch innermolekulare und zwischenmolekulare Bindungen zerbrochen werden. Bei der durch Alkalibehandlung erfolgten Umwandlung werden Peptidketten (Amidverbindungen) getrennt. Durch Zerschlagen der kovalenten Bindung CO-NH-CO tritt unter Zurücklassung einer Karboxylgruppe Verlust von NH_3 ein. Bei der durch Säurebehandlung gewonnenen Gelatine werden einige Peptidketten und alle Säurebindungen zerbrochen. Die NH_2 -Endgruppe reagiert dabei mit der COOH -Endgruppe einer zweibasischen Aminogruppe und bildet $-\text{CO-NH}-$. Die Verleimung besteht demzufolge lediglich in einer Strukturänderung des Molekülgitters. Der Grund für das unterschiedliche Verhalten von verleimten und rohem Kollagen gegen Anilinblau dürfte also in den unterschiedlichen Strukturen begründet sein, die der Farbstoffdiffusion verschieden stark entgegenwirken.

SEKI (55) hat bei Färbungsversuchen mit Orange G und Anilinblau festgestellt, daß Orange G rascher in Gelatine eindringt, diese aber nur wenig anfärbt, während das Anilinblau die Gelatine langsamer durchdringt, diese aber gut anfärbt. SEKI vermutet, daß sowohl die Größe der Farbstoffmoleküle als auch deren Ladung dieses Verhalten der Farbstoffe gegenüber Gelatine verursachen.

Bei den Diffusionsversuchen in freier Phase zeigte sich ebenfalls für Orange G eine wesentlich größere Diffusionsgeschwindigkeit als für Anilinblau, wodurch die Annahmen SEKIs als bestätigt betrachtet werden können.

Der Grund dafür, daß mit steigendem NaCl -Zusatz zu Gelatine die Färbungsintensität für Anilinblau schwächer wurde, ist darin zu suchen, daß die elektrostatischen Kräfte der Gelatine durch das NaCl teilweise neutralisiert wurden und das Anilinblau das Salz nicht zu verdrängen vermochte. Auch die schlechten Färberesultate, die bei gequelltem kollagenem Gewebe trotz Quellung mit HCl erzielt wurden, könnten auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Salz und Eiweiß beruhen.

Die geringe Quellung der Gelatine in Formalin ist damit zu erklären, daß sich dabei zwischen den Aminogruppen der benachbarten Moleküle $-\text{CH}_2-$ Brücken bilden, welche durch Zugabe von Wasser oder durch vorsichtiges Erhitzen nicht reißen; Gele von formolisierter Gelatine quellen daher nur bis zu einem bestimmten Maße im Gegensatz zu unbehandelter Gelatine (14).

Für die Farbelektion bei der Anilinblau-Orange-Färbung könnte vermutet werden, daß diese Differenzierung auf Grund streng chemischer Reaktionen zwischen Muskeleiweiß und Orange G einerseits und zwischen Kollagen und Anilinblau andererseits zustandekommt. Diese Annahme wird aber durch die Beobachtung weitgehend widerlegt, daß beide Farbstoffe durch Wässern restlos aus den Substraten entfernt werden konnten.

Die vorliegenden Versuche bestärken die Annahme, daß Anziehung und Anlagerung der Farbstoffe durch Ionenkräfte bewirkt werden, sowohl im Muskeleiweiß als auch im Kollagen. Daß sich das Orange G im Muskeleiweiß und das Anilinblau im Kollagen festsetzen, ist durch die Teilchengröße der Farbstoffe und durch die Zwischenräume im Fasergefüge der Substrate bedingt. Für das Eindringen von Anilinblau ist also eine Quellung des Kollagens unbedingte Voraussetzung.

Nach SEKI (56) wird durch die Fixation die elektrochemische und die mechanische Beschaffenheit (Strukturdichte) der Substrate beeinflusst. Bei der Prüfung des Einflusses verschiedener Fixierungsmittel auf die Färbbarkeit von Gelatine, rohen Sehnen und Schwarten sowie von koaguliertem Muskelbrei war anzunehmen, daß Müllersche Flüssigkeit, Orths Gemisch, B-15 und Trichloressigsäure zu jenen Fixierern zu zählen sind, welche die elektrochemische Beschaffenheit der Substrate beeinflussen. Desweiteren gehört in diese Gruppe Salyrgan-Natrium, welches die SH-Gruppen des Kollagens blockiert. Wenn nach den Versuchen mit diesen Fixierungsmitteln die Gelatine eine Ausnahme zu machen scheint, so dürfte dieses damit zu erklären sein, daß das Anilinblau in der Gelatine mehr auf Grund der Größe seines Farbstoff-Anions angelagert wird und nicht so sehr wegen seiner nur schwachen negativen Ladung.

Die mechanische Beschaffenheit der Substrate wird besonders von Sulfosalicylsäure und Harnstoff infolge ihrer starken eiweißfällenden Wirkung verändert(53).

Die Fixationsmittel können aber hinsichtlich ihrer Wirkung nicht scharf voneinander getrennt werden, viele haben sowohl elektrochemische als auch mechanische Wirkungen auf das Substrat. Schließlich ist auch die auf die Fixation folgende Behandlung von Bedeutung, sei es daß das Substrat gewässert, in Alkohol gebracht oder sonstwie behandelt wird.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Literatur über das Wesen der histologischen Färbung wurde besprochen.
2. Der Einfluß der Fixation auf die Färbbarkeit histologischer Substrate beruht auf zwei verschiedenen Wirkungen: Einmal wird die elektrochemische Beschaffenheit der Substrate geändert, zum anderen die mechanische (Strukturdichte). Bei der Auswahl der Fixationsmittel ist dies zu berücksichtigen.
3. Die differenzierte Darstellung von Muskeleiweiß und Kollagen mittels der Anilinblau-Orange-Eisessig-Lösung kann nicht mit einer chemischen Reaktion nach Art einer Salz- bildung zwischen Protein und Farbstoff erklärt werden. An- ziehung und Anlagerung dieser Farbstoffe dürften durch Ionen- kräfte bedingt sein. Für die Differenzierung sind das Dif- fusionsvermögen der Farbstoffe bzw. die Größe des Farb- stoff-Anions und die Strukturdichte der Substrate verantwor- tlich. Anilinblau kann nur in gequollenes kollagenes Gewebe eindringen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ames, W.M.: The Conversion of Collagen to Gelatin and their Molecular Structures.
J. Sci. Food Agric. 3 (1952), 454;
2. Auerbach, R.: Neuere kolloidchemische Anschauungen über Färbevorgänge
Mell. Textilber. 8 (1927), 160;
3. Baeyer, A. von: In Karrer, P.: Lehrbuch der organischen Chemie.
13. Auflage, S. 541, Georg Thieme Verlag
Stuttgart 1959;
4. Becher, S.: Untersuchungen über Echtfärbung der Zellkerne
mit künstlichen Beizenfarbstoffen und die Theorie des histologischen Färbeprozesses mit gelösten Lacken.
Berlin 1921;
5. Bethe, A.: Zit. nach Pischinger (45);
6. Bolam, T.R.: Die Donnan-Gleichgewichte und ihre Anwendung
auf chemische, physiologische und technische Prozesse.
Kolloid-Beihefte 39 (1934), 139;
7. Donnan, F.G.: Theorie der Membrangleichgewichte und Membran-
potentiale bei Vorhandensein von nicht dialysierenden Elektrolyten.
Ein Beitrag zur physikalisch-chemischen Physiologie.
Zschr. Elektrochemie 17 (1911), 572;
8. Ehrlich, P.: Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1879;
166, 571; Z. klin. Med. 1 H. 3 (1880);
Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie
u. Klinik des Blutes.
Berlin 1891. Zit. nach Zeiger (65);

9. Elöd, E.: On the theory of the dyeing process. The influence of acid-dyes on animal fibres.
Trans. Faraday Soc. 29 (1932), 327;
10. Elöd, E. und F. Böhme: Über das Färben von Wolle mit Säurefarbstoffen.
Mell. Textilber. 13 (1932), 365;
11. Elöd, E. und H.G. Fröhlich: Zur Kenntnis der Färbeporgänge. Die Aufnahme von sauren und substantiven Farbstoffen durch Wolle, Seide, Ardi- und Polyamidfasern.
Mell. Textilber. 30 (1949), 579;
12. Elöd, E. und E. Silva: Studien über Beiz- und Färbeporgänge.
Zschr. physikal. Chemie 137 (1928), 142;
13. Ender, W. und A. Müller: Beiträge zur Theorie der sauren Wollfärbung.
Mell. Textilber. 18 (1937), 638;
14. Ferry, J.D.: In Haurowitz, F.: Chemistry and Biology of Proteins.
Academic Press Inc., Publishers,
New-York 1950, 1. Auf. S. 182;
15. Fischer, A.: Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas.
Verlag G. Fischer, Jena 1899;
16. Freundlich, H.: Kapillarchemie.
Akad. Verlagsges. Leipzig 1930, Band I, 4. Auflage;
17. Fröhlich, H.G.: Überblick über die Theorie des Färbens von Wolle mit sauren und substantiven Farbstoffen.
Mell. Textilber. XXXII (1951), 307;
18. Gerstner, H.: Beziehungen zwischen Konstitution und Farbstoffbindung.
Mell. Textilber. 30 (1949), 253;
19. Hardy, W.B.: J. Physiol. 22 (1899), 288; und
Zschr. physikal. Chemie 33 (1900), 385;
Zit. nach Zeiger (65);

20. Harms, H.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie.
Staufen-Verlag, Kamp-Lintfort 1957,
Teil II, 1. Lieferung, S. II/34
3. Lieferung, S. II/239;
21. Heidenhain, M.: Über chemische Umsetzungen zwischen Eiweiß-
körpern und Anilinfarben.
Pflügers Arch. 90 (1902), 115; s. a.
Theorie der histologischen Färbungen.
Enz. d. mikr. Techn., 1. Auflage,
Berlin und Wien 1903;
22. Kotter, L.: Neue Wege der histologischen Wurstuntersuchung.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschrift
20 (1955), 360;
23. Kotter, L.: Der Nachweis kollagener Substanzen in Brühwurst.
Fleischwirtschaft 9 (1957), 30;
24. Kotter, L.: Zum Nachweis kollagener Substanzen in Wurst-
waren.
Wien. Tierärztl. Wschr. 44 (1957), 705;
25. Kotter, L. und E. Degenkolb: Zur Beurteilung und zum Nachweis kollagener
Substanzen (Schwarten, Sehnen usw.).
Fleischwirtschaft 1956, Heft 4, 191;
26. Kotter, L., E. Degenkolb und E. Elfert: Zum Nachweis kollagener Substanzen bei der
histologischen Wurstuntersuchung.
Tierärztl. Umschau 4 (1956), 140;
27. Krebs, H. A.: Über die Färbbarkeit des Skelettmuskels.
Arch. mikr. Anat. 97 (1923), 554;
28. Küntzel, A.: Kolloid-Zeitschr. 40 (1926), 264.
Zit. nach Elöd und Silva (12);
29. Küntzel, A.: Physikalische Chemie und Kolloidchemie der
Eiweißkörper unter besonderer Berücksichtigung
des Kollagens.
Handbuch der Gerbereichemie und Lederfabrikation.
I/1, S. 520.

30. Lenz, W.: Zur Methodik der papierelektrophoretischen Auftrennung von Muskeleiweißkörpern.
Vet. Diss. München 1954;
31. Loeb, J.: Die Eiweißkörper.
Verlag J. Springer, Berlin 1924;
32. Loeb, J.: Proteins and the theory of colloid behavior.
New-York 1922;
33. Lottermoser, A.: Die Theorie der Färbung.
Mell. Textilber. 8 (1927), 845;
34. Meier, W.: Untersuchungen zur Theorie der Fettfärbung.
Z. wiss. Mikrosk. 64 (1959), 193;
35. Michaelis, L.: Die Adsorptionsaffinitäten des Hefeinvertins.
Biochem. Zschr. 7 (1907), 488;
36. Michaelis, L.: Der heutige Stand der allgemeinen Theorie der histologischen Färbung.
Arch. mikr. Anat. 94 (1920), 580;
37. Michaelis, L.: Zit. nach Zeiger (65);
38. Michaelis, L.: Zit. nach Romeis (53);
39. Michaelis, L. Die Adsorbierbarkeit der oberflächenaktiven Stoffe
und P. Rona: durch verschiedene Adsorbentien sowie ein Versuch
zur Systematik der Adsorptionserscheinungen.
Biochem. Zschr. 102, (1920), 268;
40. Möllendorff, W.v. Untersuchungen zur Theorie der Färbung fixierter
und H.A. Krebs: Präparate.
Arch. mikr. Anat. 97 (1923), 554;
41. Möllendorff, W.v. Untersuchungen zur Theorie der Färbung fixierter
und M.v: Präparate. II. Durchtränkungs- und Niederschlags-
färbung als Hapterscheinung bei der histologischen
Färbung.
Erg. Anat. 25 (1924), 1;

42. Ostwald, W.: Kleines Praktikum der Kolloidchemie.
Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig
1943, 9. Auflage;
43. Pelet-Jolivet, L.: Die Theorie des Färbeprozesses.
Dresden 1910;
44. Pelet-Jolivet, L. und A. Wild: Untersuchungen über die Farbstoffe in Lösung.
Kolloid-Zschr. 3 (1908), 174;
45. Pischinger, A.: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologi-
scher Elemente als Ursache ihrer verschiedenen
Färbbarkeit.
Zschr. Zellforschg. 3 (1926), 169;
46. Pischinger, A.: Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen und
ihre Beziehung zur Färbung bei verschiedenen
H-Ionenkonzentrationen.
Zschr. Zellforschg. 5 (1927), 347;
47. Prändl, O.: Zur Histochemie bei Wurstwaren.
Arch. f. Lebensmittelhygiene 9 (1958), 11;
48. Procter, H.R.: J. Chem. Soc. 105 (1914), 313,
Zit. nach Elöd und Silva (12);
49. Procter, H.R. und J. A. Wilson: J. Chem. Soc. 109 (1916), 307,
Zit. nach Elöd und Silva (12);
50. Raab, L.: Über die Wirkung verschiedener Salzlösungen
auf Gelatine und lyophilisiertes Aktomyosin.
Vet. Diss. München 1955;
51. Regaud, Cl. und A. Policard: Sur la signification de la rétention de chrome
par les tissus en technique histologique au point
de vue des lipoides et des mitochondries.
J. C. r. Soc. Biol. Paris 74 (1913).
Zit. nach Seki (56);

52. Rhode: Zit. nach Pischinger (46);
53. Romeis, B.: Mikroskopische Technik.
Leipzig Verlag, München 1948, 15. Auflage;
54. Roulet, F.: Methoden der pathologischen Histologie.
Springer Verlag, Wien 1948;
55. Seki, M.: Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung.
VIII. Über die Umladung und Flockung von Farben durch Wasserstoffionen und eine Bemerkung über die vitalfärbenden Farbstoffe.
Zschr. Zellforsch. 18 (1933), 1;
56. Seki, M.: IX. Über den Einfluß der Fixierung auf die Färbbarkeit der histologischen Elemente.
Zschr. Zellforsch. 18 (1933), 21;
57. Speakman, J.B.: The behavior of wool as an amphoteric colloid.
Part II. The chemical theory of dyeing.
J. Soc. Dyers and Colourists 41 (1925), 172;
58. Speakman, J.B. und S.G. Smith: The structure of animal fibres in relation to acid dyeing.
J. Soc. Dyers and Colourists 52 (1936), 121
59. Speck, E.: Über die Quellwirkung verschiedener Salze auf zerkleinerte Kaninchenmuskulatur bei niedriger Ionenstärke.
Vet. Diss. München 1957;
60. Tellyesniczky, K.: Über die Fixierungs- (Härtungs-) Flüssigkeiten.
Arch. mikr. Anat. 52 (1898).
Zit. nach Seki (56);
61. Valkó, E.: Wolle- und Leinenindustrie 88 (1938), 1.
Zit. nach Gerstner (18);

62. Weber, F.: Theorie und Praxis der Färbung von Textilien.
Österr. Chemiker-Z. 51 (1950), 223;
63. Witt, O.N.: Zit. nach Becher (4);
64. Zeiger, K.: Der Einfluß von Fixationsmitteln auf die Färbbarkeit histologischer Elemente.
Versuche mit hochdispersen Farbstoffen.
Zschr. Zellforschung. 10 (1930), 481;
65. Zeiger, K.: Wissenschaftl. Forschungsberichte;
Naturwissenschaftl. Reihe. Band 48
Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik.
Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig 1938.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem bisherigen Vorstand des Instituts, Herrn Professor Dr. H. Sedlmeier für die freundliche Anteilnahme an meiner Arbeit ergebenst zu danken. Auch den Herren Privatdozent Dr. L. Kotter und Dr. O. Prändl schulde ich Dank für die zahlreichen Anregungen und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

LEBENS LAUF

Ich, Karl-Artur Beller, wurde am 8. Januar 1935 als Sohn des Metzgermeisters Karl Beller und dessen Ehefrau Pia, geb. Stettelmann, in Kenzingen/Breisgau geboren.

Nach vier Jahren Volksschulbesuch trat ich 1945 in das Progymnasium in Kenzingen ein. Vom Sommer 1951 bis zum Abitur im März 1954 besuchte ich das Rotteck-Gymnasium in Freiburg/Breisgau.

Im Sommersemester 1954 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Universität München. Während des 6. und 7. Semesters studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule in Wien, kehrte im Wintersemester 1957/58 wieder an die Universität München zurück und schloß mein Studium am 23. Februar 1959 mit der Tierärztlichen Prüfung ab.

Vom 15. März bis 15. Juni 1959 arbeitete ich als Veterinärpraktikant am Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Seit 1. Januar 1960 bin ich als Veterinärpraktikant bei Herrn Dr. W. Fischer, prakt. Tierarzt, in Meßkirch/Baden.

Mit der vorliegenden Arbeit war ich seit August 1957 beschäftigt.

